VISIT…

LANZAROTE
Caliente.COM

PHYSICAL BIOCHEMISTRY

Applications to Biochemistry and Molecular Biology

DAVID FREIFELDER
Brandeis University

W. H. FREEMAN and COMPANY
San Francisco

Д. Фрайфелдер

ФИЗИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

Применение физико-химических методов в биохимии и молекулярной биологии

Перевод с английского
канд. хим. наук Е. С. Громовой
и канд. хим. наук С. В. Яроцкого
под редакцией
проф. З. А. Шабаровой

Издательство «Мир»
Москва 1980

УДК 578.088

Книга представляет собой уникальное по своему охвату и стилю изложения учебное руководство, посвященное физическим и физико-химическим методам, которые используются при исследованиях в области биохимии и молекулярной биологии. Основная задача этих исследований — изучение живых систем на молекулярном уровне.

Предназначена для студентов и молодых специалистов, которым она позволит в короткий срок получить представление о возможностях наиболее распространенных методов (авторадиографии, хроматографии и электрофореза, седиментации и др.) для изучения широкого круга биологических объектов.

Редакция литературы по химии

2603040000

Ф $\frac{20505\text{-}103}{041(01)\text{-}80}$ 103-80

© 1976 by W. H. Freeman and Company

© Перевод на русский язык, «Мир», 1980

Предисловие редактора перевода

Современная биохимия, молекулярная биология и ряд смежных с биохимией дисциплин ставят своей основной задачей изучение живых систем на молекулярном уровне. Решение столь сложной проблемы невозможно без использования самых разных современных высокочувствительных методов. Однако часто исследователь, особенно начинающий, не может выбрать наиболее эффективный путь изучения какого-либо объекта просто потому, что не представляет себе достаточно ясно, какой именно метод в данном случае способен дать необходимую информацию. В отечественной и зарубежной литературе имеется много монографий и учебных пособий, посвященных современным физико-химическим методам исследования и их применению в различных областях физики, химии и биологии. Но они написаны для узких специалистов и, как правило, могут быть эффективно использованы лишь лицами, обладающими глубокими специальными знаниями.

Основной отличительной чертой предлагаемой советскому читателю книги Д. Фрайфелдера «Физическая биохимия» является то, что в ней описываются практически все физико-химические методы, которые используются в современной биологии. Соответствующие разделы включают материал, достаточный для освоения теории и экспериментальных приемов в том объеме, который необходим для первого ознакомления с методом экспериментаторов, не являющихся специалистами физиками или физикохимиками. Для понимания основных принципов, лежащих в основе того или иного метода, не требуется знаний, выходящих за пределы общих университетских курсов математики и физики, читаемых биологам.

Таким образом, книга Д. Фрайфелдера представляет собой достаточно полное и одновременно доступное по форме учебное руководство, помогающее понять и использовать на практике многие современные физические и физико-химические методы исследования. Она предназначена для студентов старших курсов, специализирующихся в области биохимии и молекулярной биологии. В основе ее лежит курс лекций, читавшихся автором в течение многих лет. Отсутствие математического аппарата при объяснении теоретических основ различных методов не помешало автору изложить основные физические принципы, необходимые для уяснения области применения каждого из методов, на вполне современном уровне.

Каждая глава содержит достаточно большое количество подробно описанных вариантов применения рассматриваемого мето-

да на примере изучения белков и нуклеиновых кислот. Достоинством книги является также и то, что в ней приводится сравнительный анализ эффективности различных методов исследования и дается оценка различных подходов к интерпретации наблюдаемых явлений.

После каждой главы приводятся контрольные вопросы, правильные ответы на которые подразумевают использование соответствующего метода. В конце книги приведен очень полезный словарь терминов, применяемых в литературе по биохимии и молекулярной биологии.

Необходимо иметь в виду, что стремление к популярному изложению основ метода и охвату большого числа методов неизбежно обусловило определенную схематичность изложения. Данную монографию следует рассматривать как учебное пособие для первого ознакомления и выбора метода. Заинтересованный читатель может получить более глубокие знания из специальных книг и пособий.

В редактировании отдельных глав книги приняли участие Н. Л. Чеботарева и В. Л. Друца. Кроме того, большую помощь при переводе некоторых глав оказали профессора МГУ Ю. С. Ченцов, М. Г. Кузьмин, Ю. А. Устынюк, ст. н. с. В. К. Каграманова, В. В. Романов и Н. Б. Куплетская, которым мы приносим искреннюю благодарность.

Книгу Д. Фрайфелдера можно рекомендовать в качестве учебного пособия для студентов старших курсов химических и биологических факультетов. Вместе с тем она очень полезна для начинающих исследователей, занимающихся изучением структуры и свойств биополимеров.

З. Шабарова

Предисловие

Предметом изучения современной биохимии и молекулярной биологии являются функции биологических систем. Столетие назад единственным методом исследования было непосредственное наблюдение таких систем в процессе их функционирования. В настоящее время при помощи электронной микроскопии и других специальных методов, разработанных в последние 40 лет, можно проводить множество сложных и детальных исследований.

В конце XIX в. ученые поняли, как много можно выяснить при изучении химии клеток. В последующие десятилетия биохимики применяли различные химические методы и при этом были достигнуты действительно большие успехи. Возможно, что наиболее эффективным было применение радиоактивных меток, которое столь сильно повысило чувствительность методов обнаружения, что позволило идентифицировать ряд биологически важных молекул. По мере того как все более высокие требования предъявлялись к чувствительности методов для разделения различных компонентов биохимических реакций, все большее распространение получали хроматография и электрофорез.

Когда биология привлекла внимание физиков и физикохимиков (возможно, потому, что живые клетки способны создавать локальный порядок несмотря на то, что законы физики утверждают в мире тенденцию к разупорядочению), то для исследования биологических систем начали применяться такие физические и физико-химические методы, как гидродинамика, спектроскопия, рассеяние и дифракция.

Заметным достижением биохимии стало открытие того факта, что биологические системы содержат не только малые молекулы, которые представляют интерес для органической химии, но также гигантские молекулы, *макромолекулы*, молекулярная масса которых, как мы теперь знаем, может в 10^{11} раз превышать массу атома водорода. Для макромолекул в биологических системах характерна специфичность, которую они проявляют как в биологических реакциях, так и в формировании структурных единиц. За последние 20 лет огромные усилия в биохимии и молекулярной биологии были направлены на то, чтобы охарактеризовать макромолекулы и установить природу взаимодействий между ними. Это потребовало разработки сложных методов как для разделения и очистки, так и для детального наблюдения за отдельными небольшими участками молекул. Основная часть книги посвящена методам изучения макромолекул, при помощи которых можно ответить на следующие вопросы:

1. Какова тонкая структура на атомном уровне макромолекул или их агрегатов?

2. Какие свойства макромолекулы определяют ее структуру и какие силы участвуют в ее стабилизации?

3. Если к макромолекуле присоединены другие молекулы (либо малые молекулы, либо другие макромолекулы), то какова их структура, сколько имеется мест присоединения и каковы физические константы (например, константа диссоциации) образующейся связи?

4. Где расположены отдельные макромолекулы в клетке и в такой маленькой частице, как вирус?

Необходимо отметить, что наибольший интерес представляют физические параметры и структура. Такой вывод следует из предположения о том, что эти характеристики определяют биологическую функцию. Так, белок с определенной функцией (например, фермент) можно представить себе как активный центр, состоящий из нескольких аминокислот, соединенных α-спиралями, складчатыми β-структурами, β-изгибами и нерегулярными участками цепи, поэтому активность белка определяется его структурой.

В настоящее время тонкую (на атомном уровне) структуру макромолекулы можно определить только при помощи рентгеноструктурного анализа; до сих пор не существует другого метода, который дал бы бóльший толчок к изучению макромолекул. (Отметим, например, к какому развитию генетики привело определение структуры ДНК.) Зная несколько тонких структур, мы не только можем установить правила определения структуры молекул данного типа, но также получить тестовые (с известной структурой) молекулы для изучения их другими методами, что дает возможность интерпретировать полученные данные. К сожалению, рентгеноструктурный анализ — очень сложный и трудоемкий метод, и часто требуются годы для установления структуры белка или макромолекулярного комплекса. Обычно в книгах, посвященных исследованию биологических макромолекул, приводится общее описание теории дифракции рентгеновских лучей. Однако в данной книге оно отсутствует по двум причинам: во-первых, маловероятно, что читатели, за некоторым исключением, будут применять этот метод или им придется расшифровывать рентгенограмму; во-вторых, фактически невозможно исчерпывающе объяснить принципы и аналитические методы в книге такого объема, как эта. Однако во всех разделах книги приведены ссылки на литературу, в которой читатель может получить информацию о каждом конкретном методе анализа.

Студенты, желающие понять логику современной биологической мысли, могут найти прекрасные работы, в которых излагаются биологические факты и теории, как мы их сегодня представ-

ляем. Однако студенты, систематически читающие периодическую научную литературу, понимают необходимость знакомства с технической стороной дела. Подобная информация содержится в учебниках по биофизической химии, где дан прекрасный теоретический анализ существующих методов и детальные математические выкладки, описывающие физическую сущность данного метода. Имеются и доступные руководства, в которых описано применение различных инструментов и методов.

После многих лет преподавания физической биохимии я понял, что студент, порабощенный математическими выкладками, редко достигает достаточно хорошего понимания метода и редко относится критически к работам, описываемым в научной литературе. Более того, многим студентам просто недостает математической подготовки для извлечения информации из стандартного математического подхода. Исходя из этого, я преподаю физическую биохимию, полностью опуская математические выкладки. Рассматривая какое-либо уравнение, я стараюсь объяснить, какие допущения были сделаны при его выводе и какие условия должны удовлетворяться для его применения. Методики описываю подробно, причем, главным образом, словами. Кроме того, привожу много примеров, которые объясняют их применение. Я чувствую, что такой подход дает хорошие результаты, и эта книга написана по тому же принципу. Математические выводы приведены для тех преподавателей, которые считают, что это необходимо для полного понимания материала. Основная цель этой книги — дать студентам необходимые знания для чтения и понимания текущей литературы.

Книга предназначена для студентов старших курсов и аспирантов, которые имеют подготовку в области химии и физики. Для некоторых приведенных здесь методов (особенно в разделе спектроскопии) требуется более основательное знание физики, и для овладения ими студенты должны обратиться к помощи преподавателя. В процессе работы над книгой многие исследователи помогали мне своими отзывами, и мне было приятно обнаружить, что книга полезна этим людям, поскольку она расширяет знание методов, получивших развитие после окончания их учебы.

Мне бы хотелось поблагодарить всех, чья помощь оказалась бесценной при подготовке рукописи к печати: Элиотта Андрофи, Дана Альтермана, Кэрол Орр и Йона Тьюмена — четырех студентов, оканчивающих Брандейский университет, и Роберта Сува, аспиранта того же университета, который исправлял двусмысленные и неточные выражения в рукописи; Эндрью Брауна, который исправлял опечатки в готовой рукописи; Ричарда Мандела, без помощи которого я не смог бы написать главы по спектроскопии; Алфреда Редфилда, Элен Ван Вьюнакис, Лоренса Левина, Роберта Болдуина, Бруно Зимма, Росса Фелдберга,

Шервина Лерера, Ингу Малер и Сержа Тимашева, которые прочитали отдельные главы; Фила Хануолта, Пауля Шимела и Петера фон Хиппеля, которые проверили рукопись, подготовленную к публикации. Далее я благодарю всех тех, кто предоставил мне возможность воспроизвести в книге рисунки и фотографии из своих работ. Я благодарю также Милдред Кравиц и Барбару Наги, которые напечатали тысячи страниц, прежде чем книга приобрела окончательный вид. Мой последний неоплатный долг — перед моей женой Дороти, которая читала гранки и которая применила свое необыкновенное искусство корректора, ученого, редактора и логика, требуя совершенства от меня и этой книги.

Февраль 1976 г.

Дэвид Фрайфелдер

ГЛАВА 1

Характеристика макромолекул

Около полувека назад усилия биохимиков были направлены на то, чтобы попытаться установить все химические *реакции*, происходящие в живых клетках. При этом предполагали, что большинство биологических свойств клеток можно будет объяснить, зная реакции, в которых образуются или расщепляются ковалентные связи. И действительно, на основании полученного огромного набора биологических реакций мы можем теперь детально представить, как при химическом распаде выделяется энергия, как происходят превращения биологических макромолекул и как из аминокислот, нуклеотидов, сахаров и липидов образуются гигантские молекулы — *макромолекулы.*

В последние 30 лет стало очевидным, что, помимо химических реакций, по крайней мере столь же важны физические *взаимодействия* между молекулами — взаимодействия, при которых не происходит ни образования, ни распада ковалентных связей. Например, *регуляция* химических реакций (т. е. степень их протекания) осуществляется как путем физических изменений структуры макромолекул, так и путем изменения реакционной способности активных центров в макромолекулах, связанных с нековалентным присоединением малых или больших молекул. Более того, особые свойства крупных агрегатов макромолекул, которые находятся в клетках или в различных частях организма (т. е. в мембранах, клеточных стенках, хромосомах, сухожилиях, волосах и т. д.), определяются нековалентными физическими взаимодействиями. Следовательно, недостаточно знать только химические реакции; для понимания сложных биологических систем необходимо также знать физические свойства составляющих их молекул. Выяснение этого и является основной задачей *физической биохимии.* Приложение полученных данных к биологическим системам лежит в основе современной науки, названной *молекулярной биологией.* Большая часть данной книги посвящена описанию методов, применяемых для характеристики макромолекул. Поскольку язык, описывающий макромолекулы, обычно незнаком студенту-биохимику, вначале будут объяснены значения терминов и понятия, которые используются при рассмотрении свойств и формы макромолекул и переходов между различными формами.

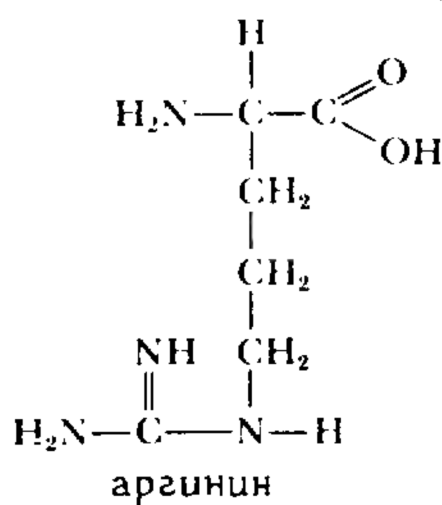
Полипептидные и полинуклеотидные цепи

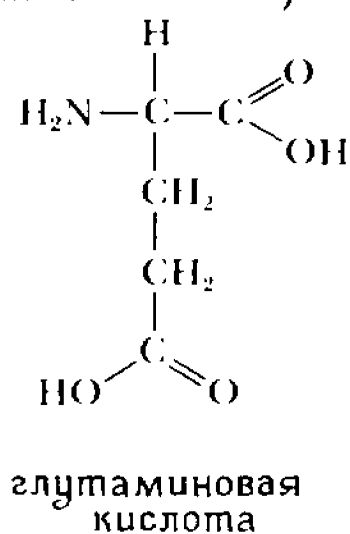
Белки и полипептиды состоят из аминокислот. Химические формулы основных аминокислот приведены на рис. 1-1, где они сгруппированы в соответствии с их обычным расположением в белках. Аминокислоты, содержащие *полярные* группы, которые достаточно сильно взаимодействуют с водой (т. е. они *сольватируются)*, называют *гидрофильными* аминокислотами. Вследствие сильного взаимодействия с водой гидрофильные аминокислоты обычно располагаются на поверхности белков, при этом достигается максимальное соприкосновение с водой. Многие аминокислоты, содержащие противоположные заряды (например, отрицательно заряженная карбоксильная и положительно заряженная аминогруппа), обычно взаимодействуют друг с другом с образованием водородных (Н) связей (рис. 1-2) и вследствие этого часто находятся в непосредственной близости. *Неполярные* аминокислоты не несут парциальных зарядов и не сольватируются заметно водой, они обычно располагаются внутри белка, тем самым сводя к минимуму соприкосновение с водой. Они называются также *гидрофобными* аминокислотами. Сульфгидрильные группы (SH) аминокислоты цистеина могут взаимодействовать с SH-группой другой молекулы цистеина с образованием *дисульфидного мостика* (—S—S—).

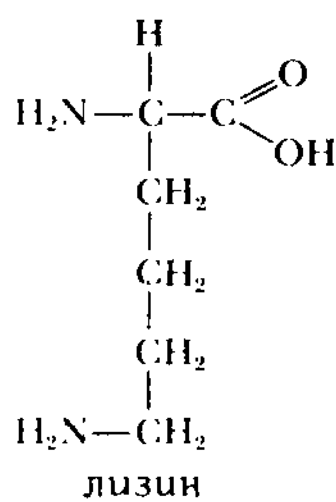
При поликонденсации аминокислот между карбоксильной группой одной аминокислоты и аминогруппой другой образуется ковалентная связь, называемая *пептидной связью.* Структура получающегося при этом соединения приведена на рис. 1-3, где R_1 (так же как R_2 и R_3) представляет собой *боковую цепь* или отличающуюся группу аминокислоты.

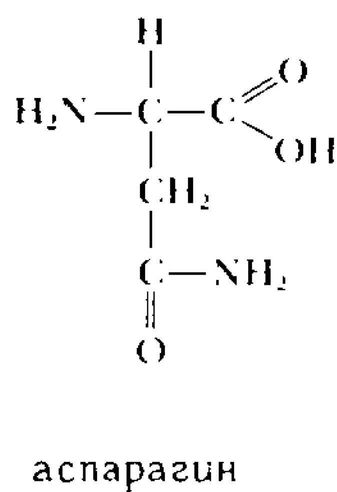
Компонентами нуклеиновых кислот являются основания, формулы которых приведены на рис. 1-4. Эти основания состоят из относительно гидрофобных циклов, которые содержат группы, способные образовывать водородные связи; при этом получаются пары оснований, показанные на рисунке. Основание ковалентно связано с сахаром (2-дезокси-D-рибоза в ДНК или D-рибоза в РНК), к которому присоединена фосфатная группа; при поликонденсации таких веществ между мономерами возникают фосфодиэфирные связи и образуются нуклеиновые кислоты, как показано на рис. 1-5. Когда между основаниями образуются водородные связи, полярная часть каждого из них становится менее доступной для воды; поскольку гетероциклы явно гидрофобны (особенно по сравнению с сахаром и заряженным фосфатным остатком), в нуклеиновых кислотах, где присутствуют водородные связи, основания расположены таким образом, что они ми-

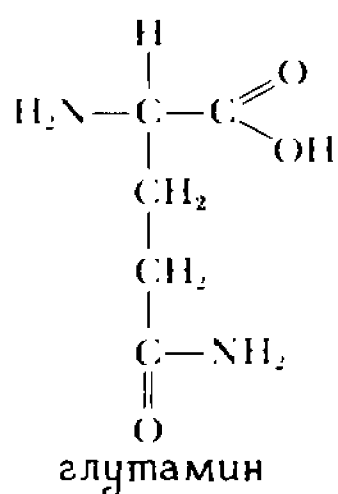
Гидрофильные аминокислоты (обычно располагаются на поверхности белка)

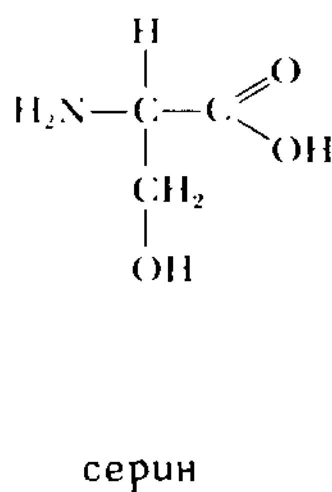

аргинин

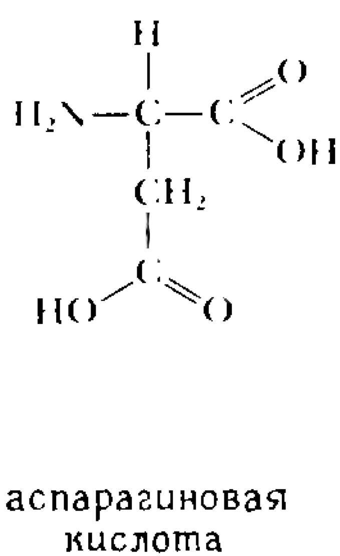

глутаминовая кислота

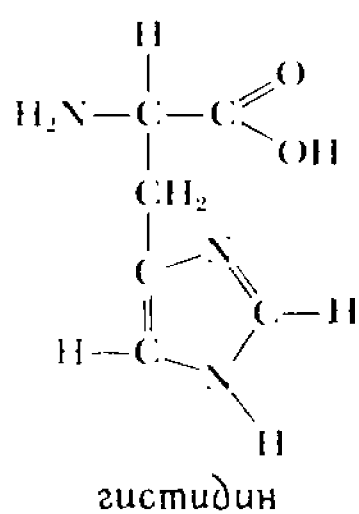

лизин


аспарагин


глутамин


серин


аспарагиновая кислота


гистидин

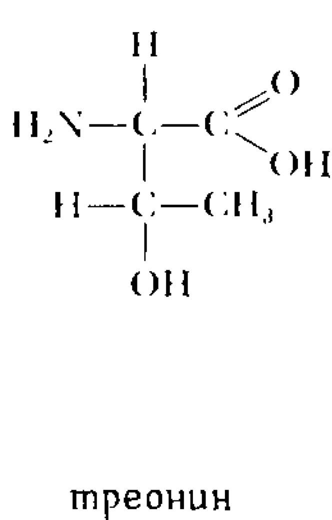
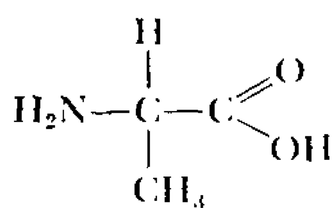

треонин

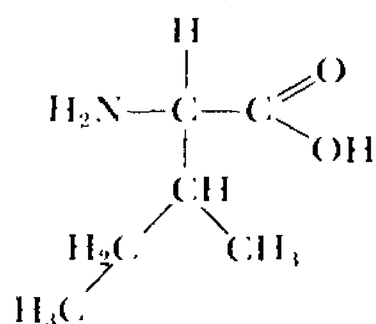
РИС. 1-1.

Аминокислоты и их химические формулы.

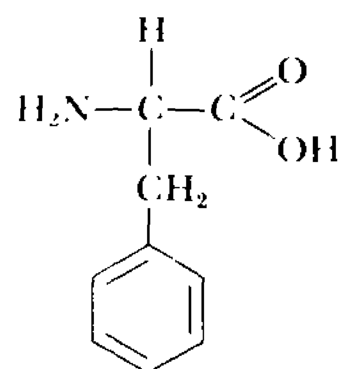
Гидрофобные аминокислоты (обычно располагаются внутри белка)



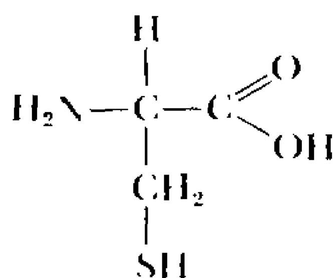
аланин



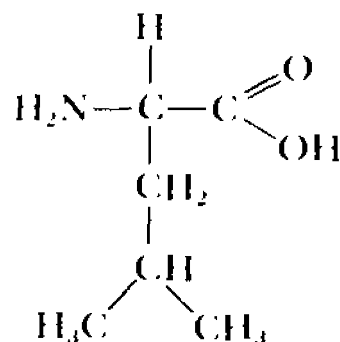
изолейцин



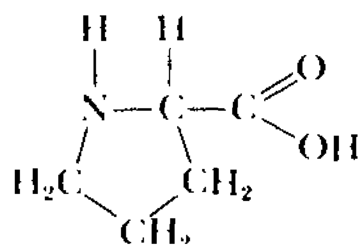
фенилаланин



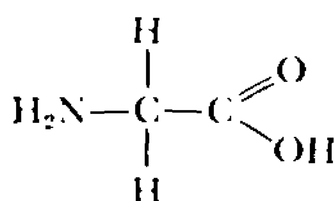
цистеин



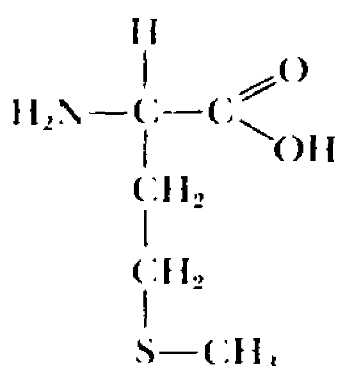
лейцин



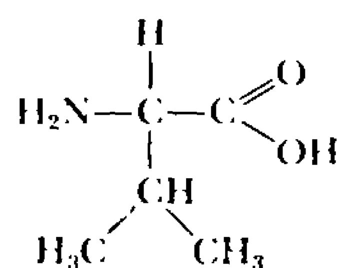
пролин



глицин

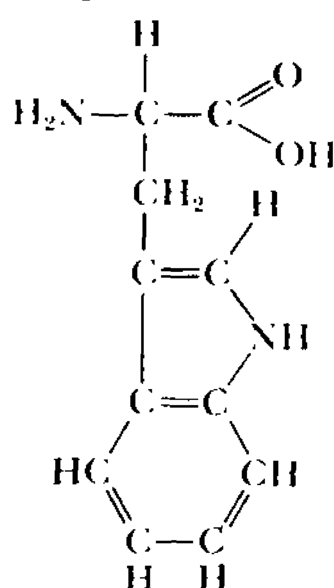


метионин

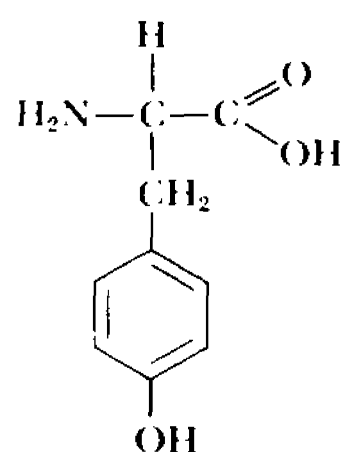


валин

Аминокислоты, способные располагаться как внутри белка, так и на его поверхности



триптофан
(неполярный)



тирозин
(полярный)

Продолжение рис. **1-1.**

A

Б

В

РИС. 1-2.

Три типа водородных связей (показаны тремя точками):

А — тип связи, обнаруженный в белках и нуклеиновых кислотах; *Б* — слабая связь, найденная в белках; *В* — тип связи, обнаруженной в нуклеиновых кислотах.

N-конец

пептидные связи

С-конец

РИС. 1-3.

Структура полипептидной цепи. Показаны N- и С-концы, пептидные связи и расположение боковых цепей (R_1, R_2 и R_3).

дезоксирибоза

дезоксирибоза

тимин

аденин

дезоксирибоза

дезоксирибоза

цитозин

гуанин

РИС. 1-4.

Две главные пары оснований в ДНК. Если обведенную пунктирной линией метильную группу заменить атомом водорода, то полученная формула будет соответствовать урацилу.

нимально соприкасаются с водой. Приведенные рассуждения позволяют объяснить тот факт, что в нуклеиновых кислотах, полностью связанных водородными связями, как в ДНК, пары оснований находятся внутри и окружены гидрофильными фосфатно-углеводными цепями.

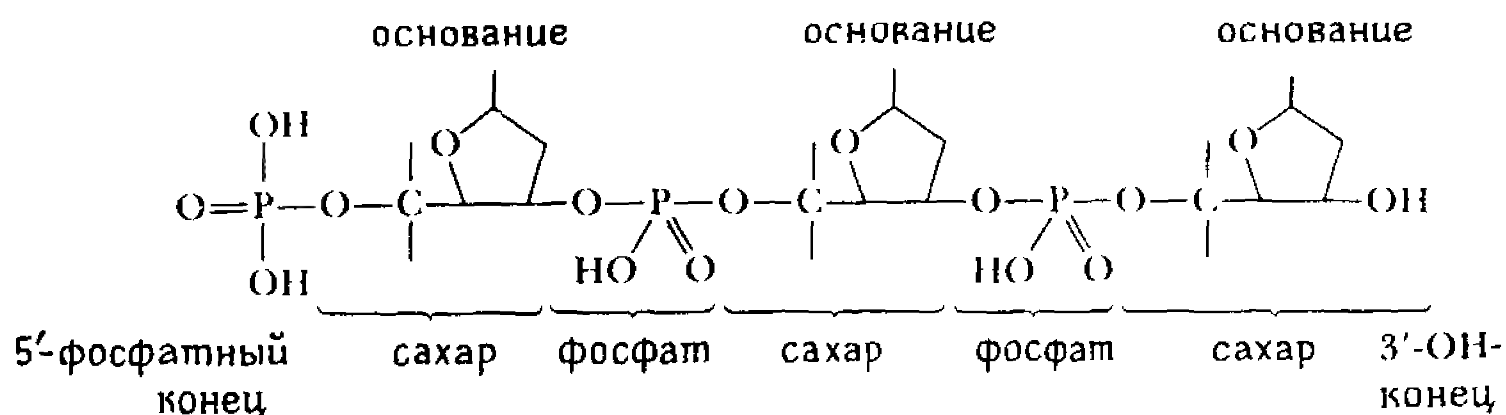


РИС. 1-5.

Структура простой полинуклеотидной цепи. Сахарные и фосфатные остатки чередуются, фосфатная группа всегда соединяет атомы углерода в положениях 3' и 5'.

Структуры полимеров

Первичной структурой полимера, состоящего из различных мономеров, является последовательность ковалентно связанных мономеров, например последовательность аминокислот в белке или последовательность нуклеотидов в полинуклеотиде. Первичная структура полимера может быть определена путем химического анализа с применением большого числа методов разделения, описанных в гл. 8 и 9. Однако сами химические методы в данной книге не будут рассмотрены.

Вследствие взаимодействия между боковыми цепями различных аминокислот в белках и между основаниями в нуклеиновых кислотах, а также взаимодействий их с водой, биополимеры редко представляют собой полностью линейные цепи; вместо этого они складываются с образованием сложных пространственных структур.

Для описания образующихся пространственных структур используют понятие о вторичной, третичной и четвертичной структурах. Под *вторичной структурой* понимают, как правило, ближние взаимодействия, приводящие в случае белков к образованию α-спиралей и β-структур, в случае нуклеиновых кислот — спиралей.

Образование *третичной структуры* определяется дальними взаимодействиями, среди которых в случае глобулярных белков основной вклад вносят гидрофобные взаимодействия. Объединение нескольких белковых глобул или пространственно организованных различных биополимеров, не связанных между собой ковалентно и функционирующих как единое целое, и определяется как *четвертичная структура*. Примерами таких структур являются вирусы, мембраны, нуклеопротеиды и т. д. Однако применение терминов «третичная и четвертичная структуры» иногда оказывается неоднозначным.

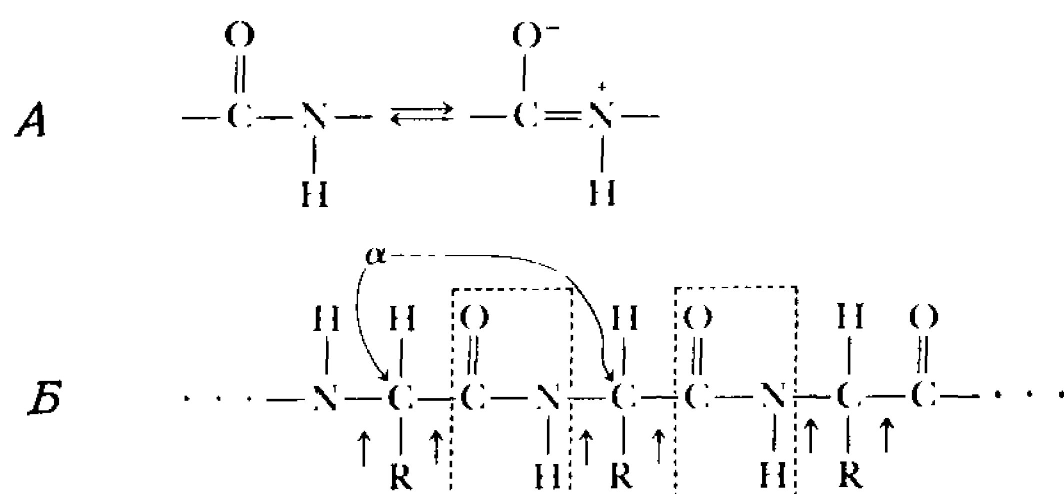


РИС. 1-6.

А — таутомерные формы пептидной связи; жесткость, возникающая из-за частично двойного характера связи, объясняет, почему пептидная связь является плоской. *Б* — часть полипептидной цепи; стрелки указывают на те связи, вокруг которых возможно свободное вращение, жесткие пептидные связи обведены рамками.

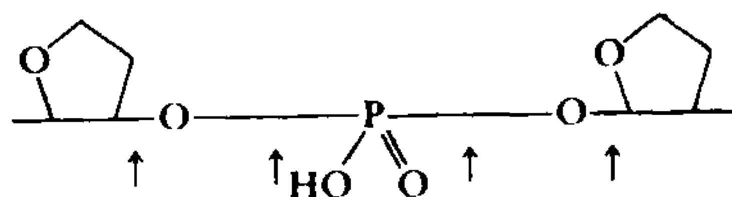


РИС. 1-7.

Фосфодиэфирная связь. Стрелками указаны связи, вокруг которых может происходить вращение.

Пептидная связь является *плоской* (рис. 1-6), что налагает ряд ограничений на возможные типы вторичных структур белков. С другой стороны, все связи, включающие α-углеродные атомы, подвижны и могут образовывать множество разных структур.

Фосфодиэфирные связи в нуклеиновых кислотах также подвижны (рис. 1-7). Однако, поскольку основания представляют собой систему плоских сильно гидрофобных колец, окруженных лишь небольшим числом способных к протонированию и депротонированию групп, они имеют тенденцию к межплоскостным взаимодействиям (гл. 16), уменьшая при этом до минимума контакт с водой. Это в свою очередь приводит к увеличению жесткости структуры, даже в случае одноцепочечного полинуклеотида.

Линейный полимер, который способен свободно вращаться вокруг многих связей в цепи и в котором нет существенного взаимодействия между боковыми группами, называется *неупорядоченным клубком* (рис. 1-8). Он не обладает определенной трехмерной структурой или формой, так как она постоянно изменяется под действием броуновского движения. Размеры клубка описываются усредненной величиной — средним *радиусом инерции*

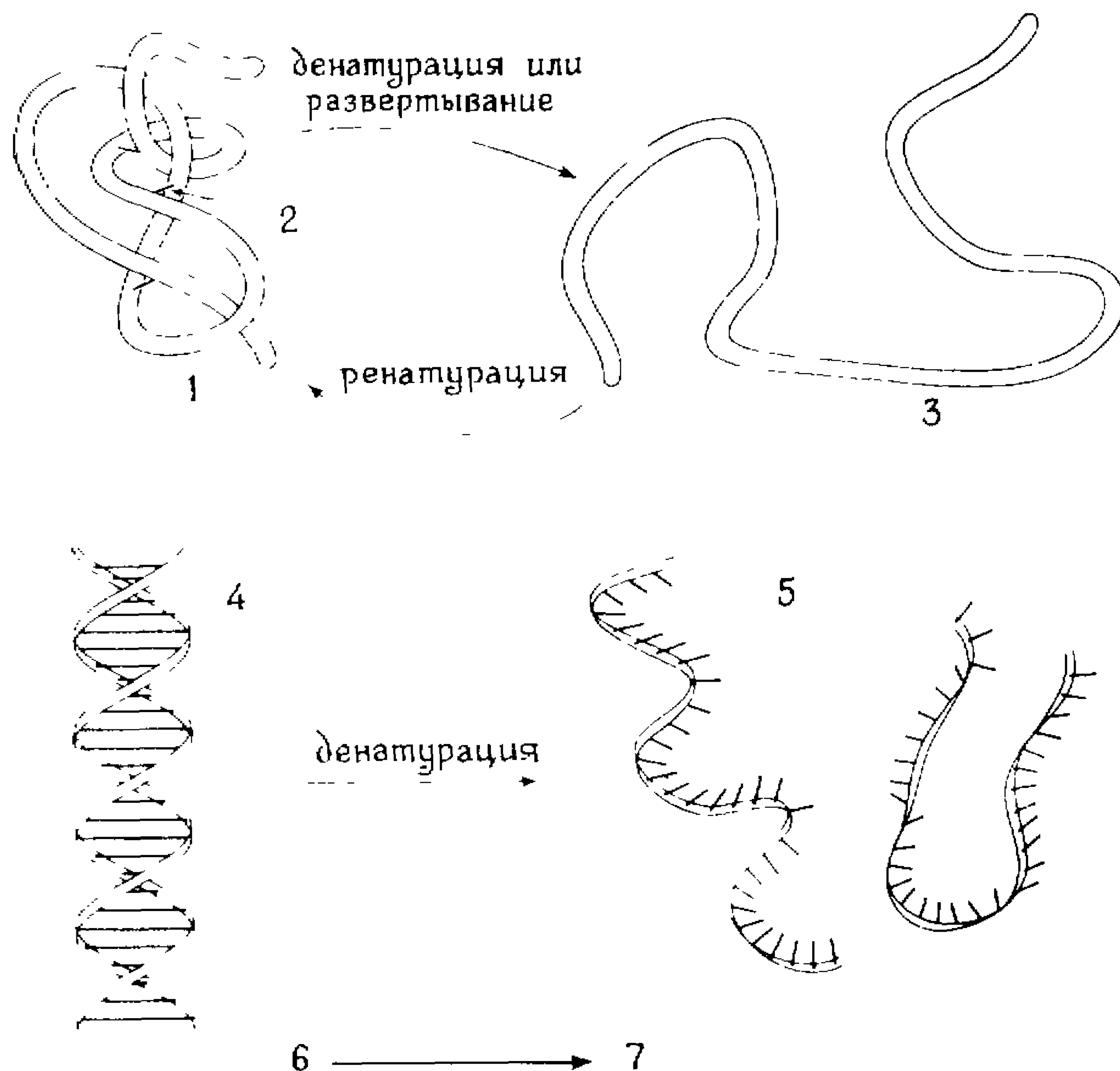


РИС. 1-8.

Некоторые формы макромолекул и их превращения.

1 — компактная молекула; *2* — дисульфидная поперечная связь; *3* — неупорядоченный клубок; *4* — стержнеобразная двойная спираль (например, ДНК); *5* — неупорядоченный клубок; *6* — нативная; *7* — денатурированная.

$$R_G = \sqrt{\frac{\sum R_i^2}{N}},$$

где N — число фрагментов (или мономеров) и R_i— среднее расстояние фрагмента i от центра тяжести. Отсюда следует, что R_G пропорционально $\sqrt{N}$. Это также величина среднего размера гипотетической сферы, в которую может быть уложен клубок. Белок, в котором все водородные связи разрушены, но осталось *несколько* дисульфидных мостиков, которые уменьшают радиус инерции, называют иногда *почти неупорядоченным клубком.*

В большинстве биополимеров имеются существенные *взаимодействия боковых цепей,* которые приводят к уменьшению размеров молекулы до меньших, чем имеет неупорядоченный клубок. Такие молекулы *глобулярны,* и часто говорят, что они *компактны* (рис. 1-8).

Многие полимеры имеют *спиральную структуру* (рис. 1-9). Для белков это означает, что плоские связи вращаются вокруг

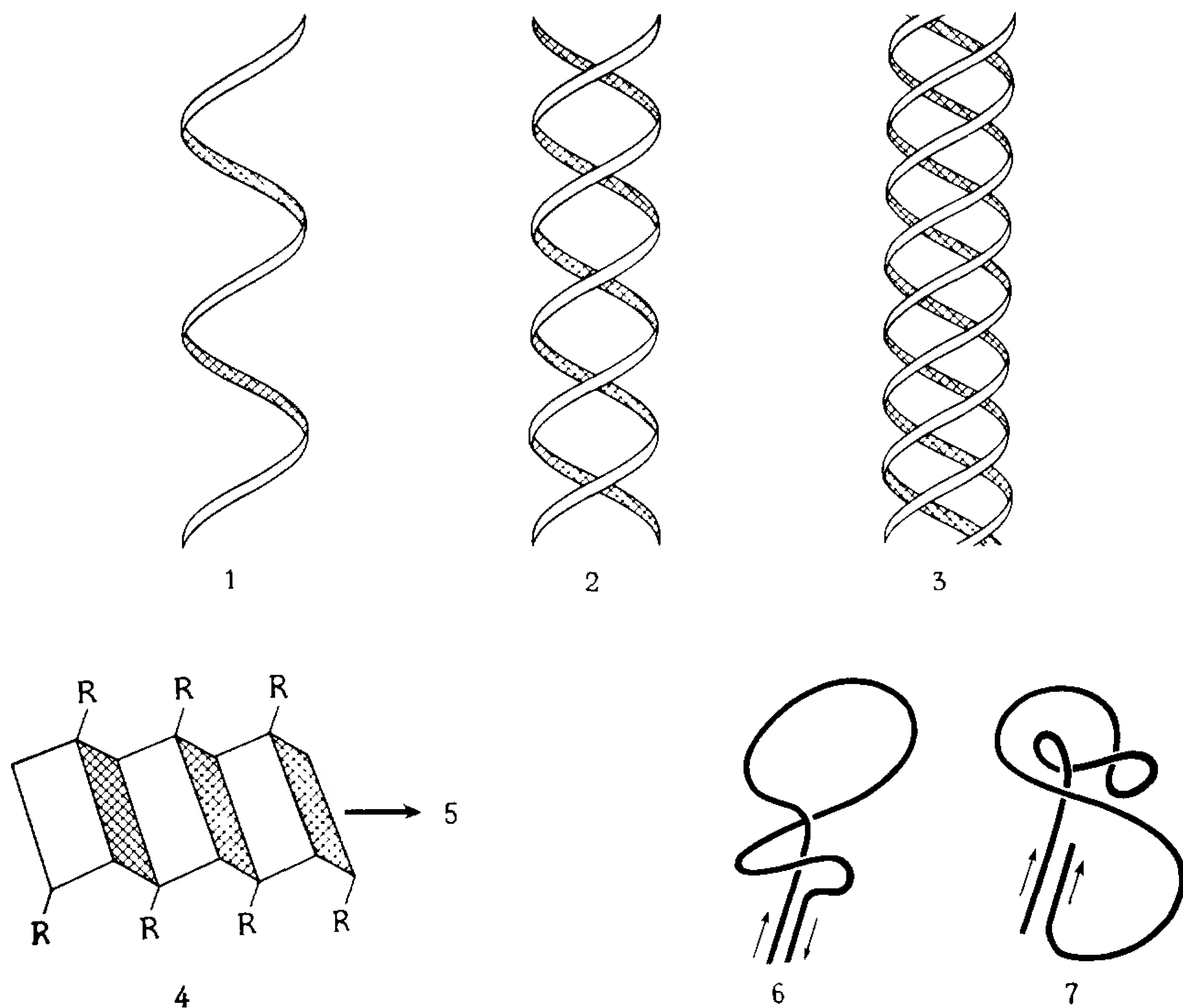
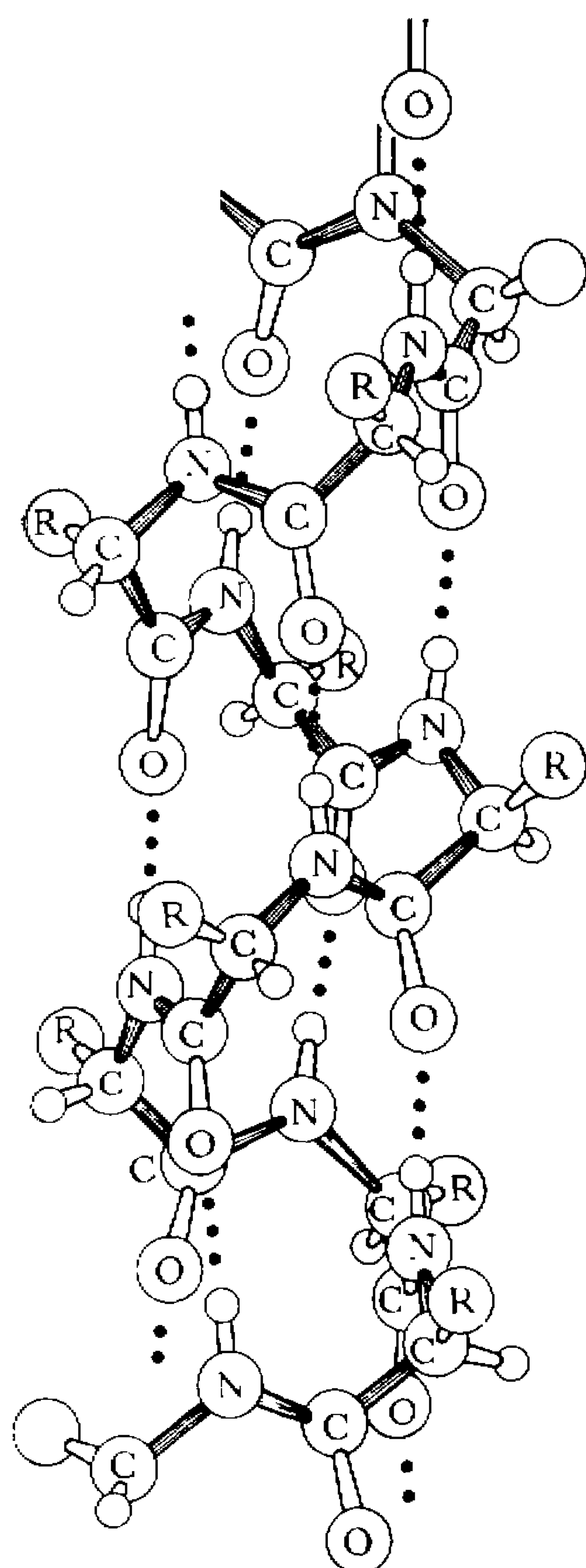


РИС. **1-9.**

Некоторые конформации макромолекул.

1 — α-спираль; *2* — двойная спираль (как в ДНК); *3* — тройная спираль (как в коллагене); *4* — β-складчатая структура; *5* — направление полипептидной цепи; *6* — антипараллельное; *7* — параллельное.

особых точек так, что вращение от плоскости к плоскости постоянно. Такая структура может перейти в цилиндрическую. Простым примером является структура, образование которой наглядно можно представить следующим образом: углы всех карт в колоде прокалывают прямой булавкой, а затем каждую карту поворачивают вокруг булавки на определенный угол по отношению к карте, лежащей снизу. Во многих белках вращение происходит у α-углеродного атома аминокислоты (рис. 1-6) и структура стабилизируется связями между карбоксильными и аминогруппами. Этот тип спирали называется α-спиралью (рис. 1-10). В полинуклеотидах плоские нуклеотидные основания располагаются одно над другим, но при этом немного поворачиваются. В ДНК две полинуклеотидные цепи (тяжи), каждая из которых вытянута вследствие межплоскостного взаимодействия, связываются между собой водородными связями и образуют *двойную*



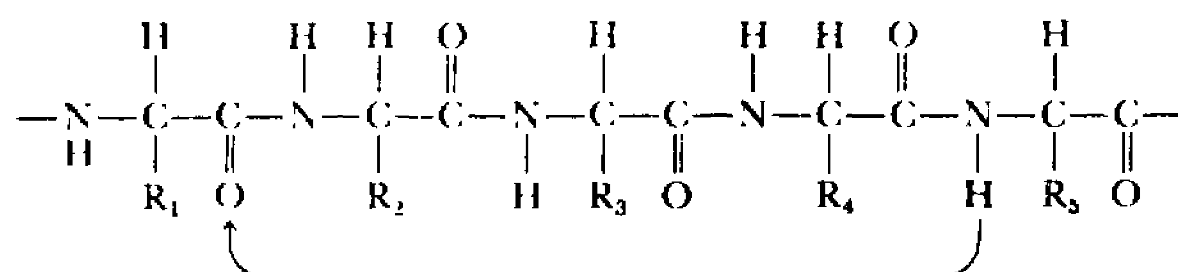


РИС. 1-10.

А — структура α-спирали (по *Pauling L.*, The Nature of the Chemical, Boud, 3d ed., Cornell University, 1960). *Б* — в α-спирали NH-группы остатка *n* связаны водородными связями с СО-группами остатка *n*—4.

спираль (рис. 1-9). Некоторые молекулы (например, белок коллаген) могут образовывать *тройную спираль*. Спиральные молекулы (одно- или многоцепочечные) являются примерами *вытянутых* или *стержнеобразных* молекул.

В белках часто встречается тип вторичной структуры, называемой β-*структурой* и характеризующейся тем, что в ней два участка полипептидной цепи (или в некоторых случаях две раз-

личные цепи) вытягиваются в линию рядом друг с другом и удерживаются вместе водородными связями. Для того чтобы число водородных связей было максимальным, полипептидные цепи складываются, как показано на рис. 1-9. В этой структуре в плоскости складки находится пептидная группа, а боковые цепи располагаются над и под плоскостью листа. На рисунке представлена только одна из нитей β-структуры; обычно вторая нить примыкает к показанной на рисунке. Эти две нити могут примыкать друг к другу (рис. 1-9) таким образом, что их направления совпадают *(параллельное)* или противоположны *(антипараллельное)*. Такие участки белка называются параллельными и антипараллельными *складчатыми* β-*структурами* соответственно.

Понятие о нативных и денатурированных структурах

Термин *нативная* структура общепринят, но ему трудно дать определение. Он может означать следующее: либо структуру макромолекулы, как она существует в природе, либо структуру макромолекулы, когда она выделена, при условии сохранения ферментной активности.

Денатурированная структура — это столь же неопределенное понятие, которое обычно означает такую форму молекулы, в которой по сравнению с нативной изменена пространственная структура. Для белков это обычно означает неупорядоченный (или почти неупорядоченный) клубок. Для двухцепочечной (нативной) ДНК этот термин означает одноцепочечную ДНК, которая может содержать или не содержать внутрицепочечные водородные связи и которая может неупорядоченно (статистически) агрегировать с одной или несколькими различными единичными цепями (тяжами). Если молекула частично утрачивает нативную структуру, то такую молекулу называют *частично денатурированной.*

Переход от упорядоченной к неупорядоченной структуре ДНК часто называют *переходом спираль — клубок,* хотя столь же часто применяется термин «денатурация». При переходах спираль — клубок обычно отмечают изменения в каких-нибудь физических свойствах молекулы, например характеристической вязкости, оптической плотности, коэффициента седиментации и т. д. Обычно переход спираль — клубок происходит при нагревании, при изменении pH и концентрации солей, а также под действием химических денатурирующих агентов, таких, как мочевина и хлоргидрат гуанидина для белков и формамид, формальдегид и этиленгликоль для нуклеиновых кислот (рис. 1-11). Температу-

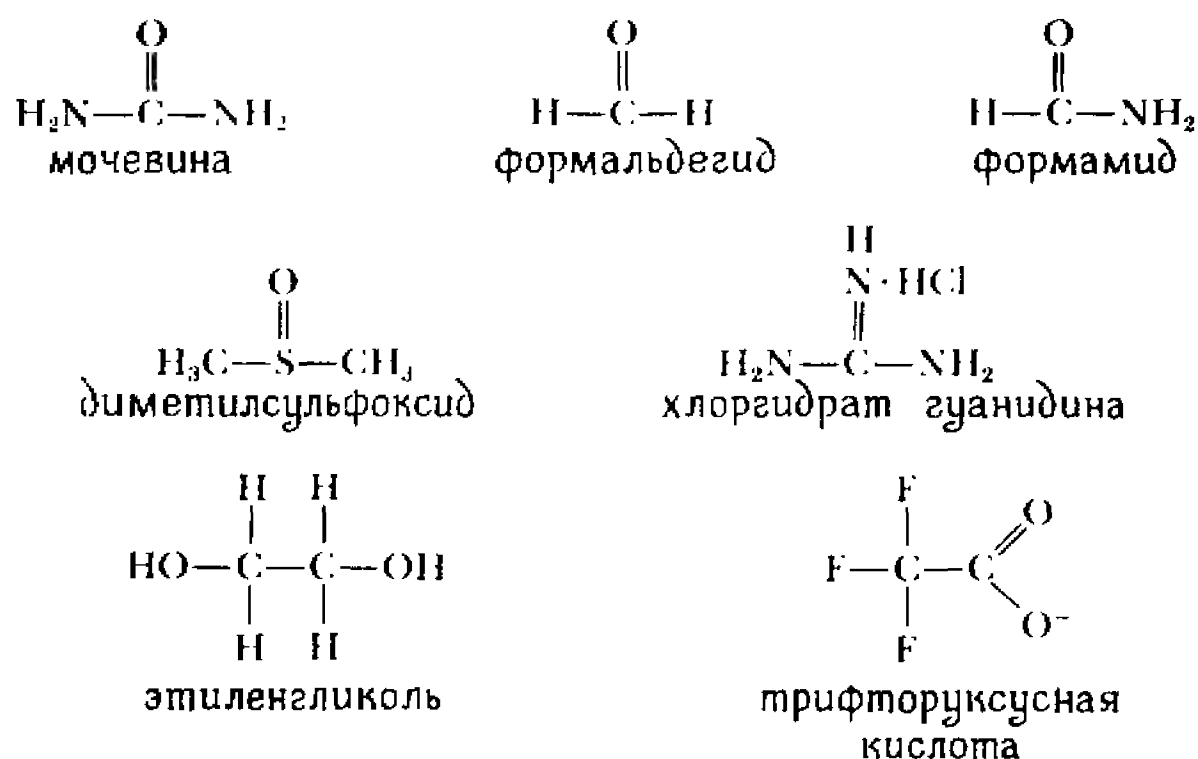


РИС. 1-11.

Некоторые распространенные денатурирующие агенты. Заметим, что многие из них содержат группы, способные образовывать водородные связи.

ру, при которой переход происходит на 50%, называют *температурой плавления* ($T_{пл}$) или реже температурой перехода. Переходы спираль — клубок часто изучают, поскольку из условий перехода можно получить ценную информацию о силах, стабилизирующих структуру макромолекулы. Примеры переходов спираль — клубок могут быть найдены в этой книге (рис. 14-15, 14-19, 16-11 и 17-12).

Термин *ренатурация* (рис. 1-8) обозначает преобразование денатурированной формы в нативную структуру. В действительности структура ренатурированной молекулы зависит от того, какие критерии используют для определения восстановления нативной конформации. В случае ДНК это относится к преобразованию отдельных полинуклеотидных нитей в двойную спираль. Для белков этот термин менее определенен.

Если структура состоит из нескольких субъединиц, их разделение иногда называют денатурацией, но чаще — *диссоциацией* (рис. 1-12). Последний термин применяют, например, для описания превращения белка, состоящего из нескольких полипептидных цепей, в смесь отдельных полипептидов. В этом случае отдельные субъединицы не обязательно денатурировали в процессе диссоциации. Напротив, разделение двух цепей ДНК всегда называют денатурацией.

Реконструкцию структуры, состоящей из субъединиц, из отдельных субъединиц *различных* структур называют *гибридизацией*. Механизмом этого процесса может быть ренатурация или реассоциация. Например, если ДНК, у которой цепи содержат изотоп ^{14}N, денатурирует и смешивается с одноцепочечной ДНК (денатурированной), меченной изотопом ^{15}N, а затем подверга-

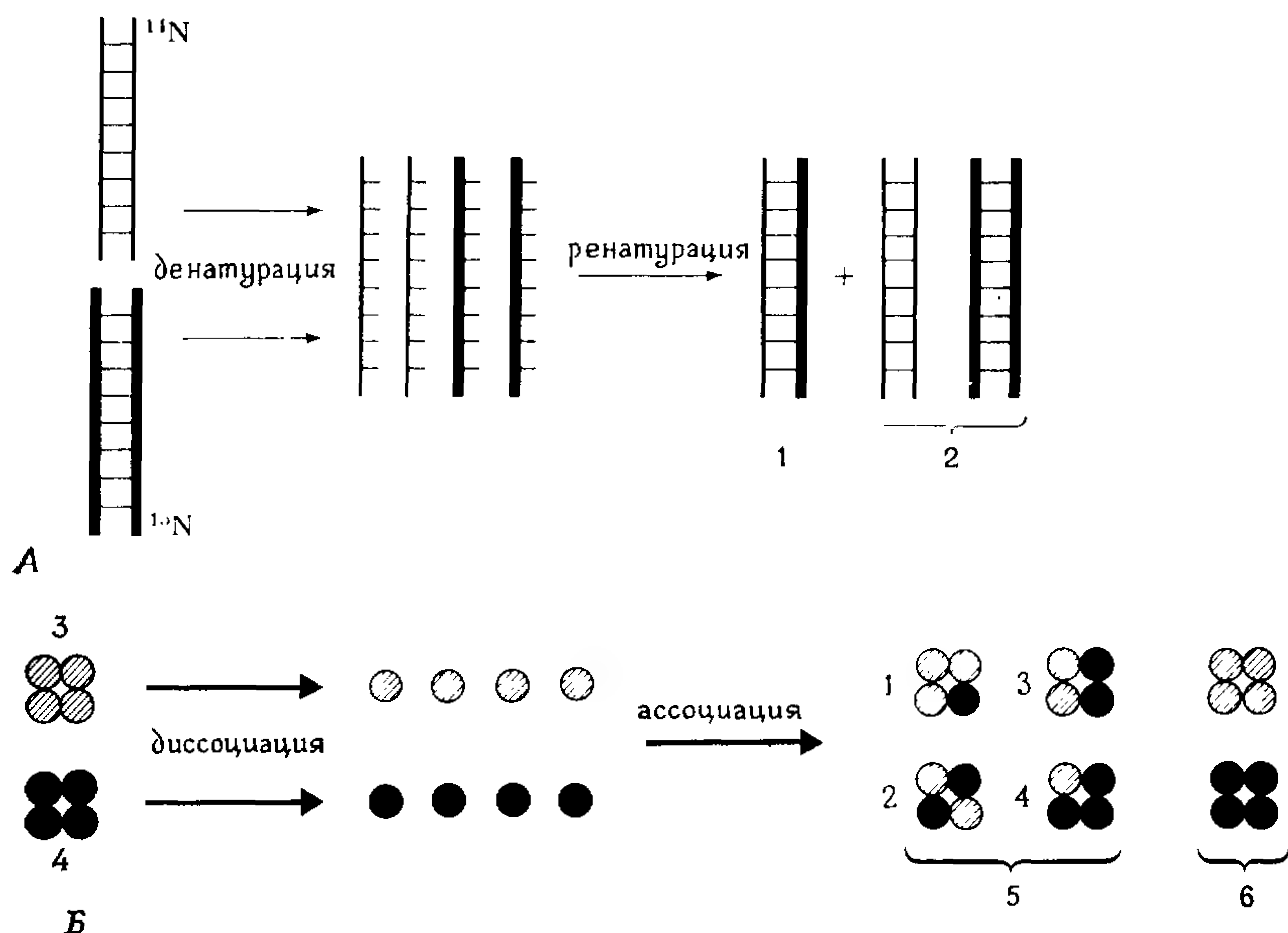


РИС. 1-12.

Гибридизация нуклеиновых кислот и белков.

А — образование гибридной ДНК. Две молекулы ДНК, содержащие или ^{14}N или ^{15}N, денатурировали с образованием одноцепочечных молекул, которые затем ренатурировали. В некоторых случаях цепи, содержащие одинаковую метку, ренатурируют с образованием исходной ДНК. Однако может образоваться также гибридная молекула ДНК, состоящая из одной цепи, содержащей ^{14}N, и другой — меченной ^{15}N. Если смешивали равные количества ^{14}N- и ^{15}N-одноцепочечных молекул, то при случайной ассоциации ренатурированная смесь будет состоять из 25% ^{14}N-ДНК, 25% ^{15}N-ДНК и 50% ^{14}N—^{15}N-ДНК (гибридной); *Б* — образование гибридных белков при диссоциации на субъединицы и реассоциации. Два белка одинакового типа (но один из ткани быка, а другой — кролика) в процессе реассоциации могут образовывать четыре возможных типа гибридных молекул, которые отличаются числом и расположением субъединиц; в молекулах типа 2 и 3 содержится одинаковое число каждой субъединицы, но они по-разному расположены. *1* — гибридная ДНК; *2* — негибридная ДНК; *3* — белок быка; *4* — белок кролика; *5* — возможные гибридные белки; *6* — негибридные белки.

ется ренатурации, то часть образующейся при этом двухцепочечной ДНК состоит из одной ^{14}N- и одной ^{15}N-цепей (рис. 1-12). Такая ^{14}N — ^{15}N-ДНК является примером *гибридной ДНК*. Аналогично двухцепочечный полинуклеотид, состоящий из одной цепи ДНК и одной цепи РНК, представляет собой другой тип гибрида — ДНК — РНК-гибрид. Белки также могут образовывать гибридные молекулы. Например, если белок, состоящий из четырех субъединиц, выделен из ткани быка и подвергнут диссоциации, а затем его смешивают с диссоциированной формой аналогичного белка из ткани кролика, то при этом субъединицы могут реассоциировать таким образом, что образуются гибридные структуры, показанные на рис. 1-12.

Линейные и циклические полинуклеотидные молекулы

Некоторые одно- и двухцепочечные молекулы ДНК (например, одноцепочечная ДНК из фага φX174 *E. coli* или двухцепочечная ДНК из фага PM-2 *Pseudomonas*) не содержат концевых нуклеотидов, потому что каждый нуклеотид ковалентно присоединен посредством фосфодиэфирной связи к следующему. Такие молекулы называются *циклическими*. Если в молекуле имеются концевые нуклеотиды, такие молекулы называются *линейными* (рис. 1-13). Если в двухцепочечной молекуле ДНК обе полинуклеотидные цепи замкнуты, то такая ДНК называется *ковалентно замкнутым циклом;* если в ней имеется один или более одноцепочечных разрывов, то цикл является *открытым* или *разрезанным*. Некоторые линейные ДНК (например, из фага λ *E. coli*) содержат короткие комплементарные одноцепочечные участки на каждом конце молекулы (т. е. участки, в которых последовательность оснований такова, что путем обычных взаимодействий аденин — тимин и гуанин — цитозин может образоваться двухцепочечная структура). Такие короткие комплементарные участки называются *липкими концами*. При соединении липких концов образуется структура, называемая *циклом Херши*. Если ковалентный цикл перекручен (представьте, что линейную двухспиральную ДНК

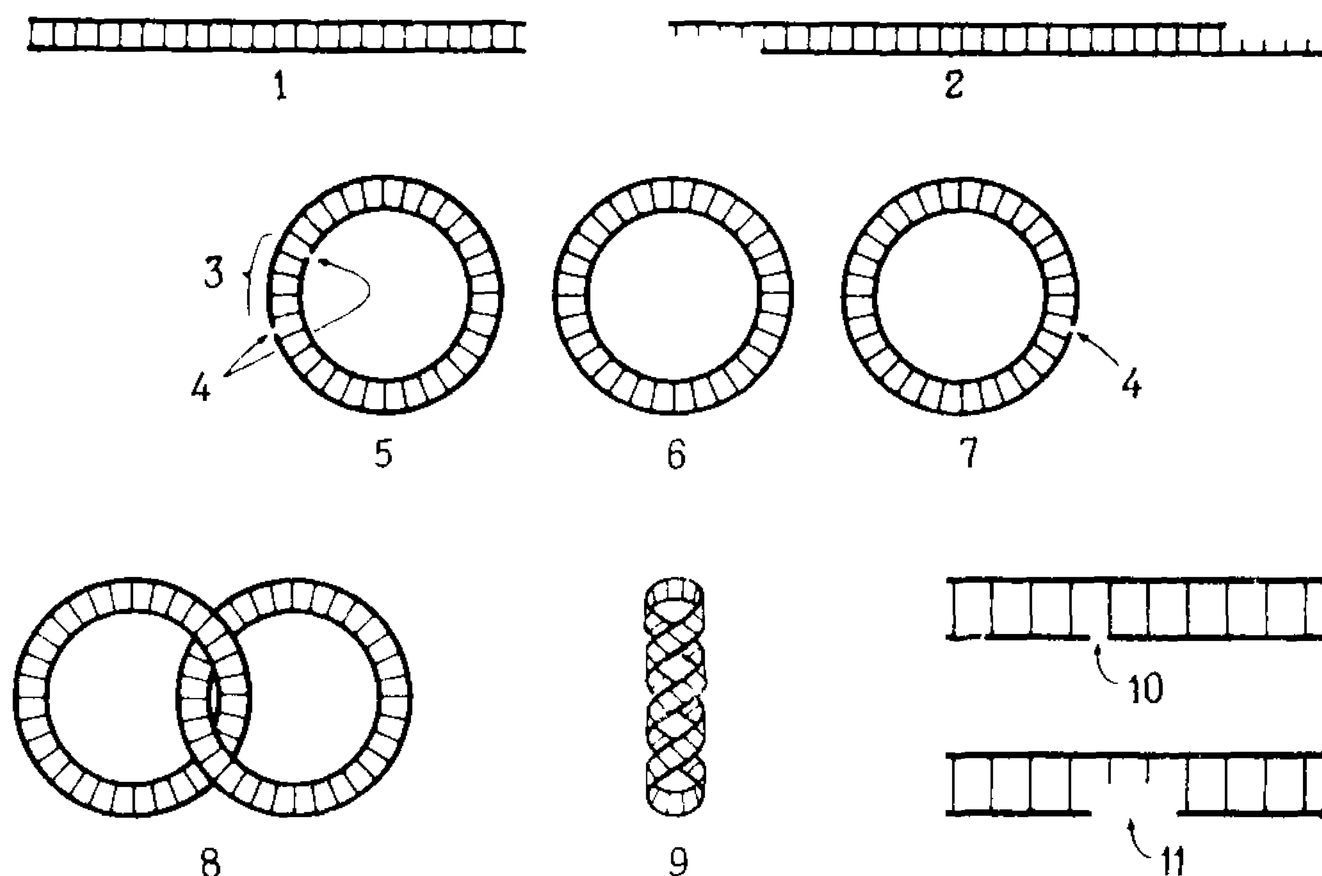


РИС. 1-13.

Различные конформации ДНК.

1 — линейная ДНК; *2* — линейная ДНК с липкими концами; *3* — перекрывающийся участок; *4* — одиночный разрыв; *5* — цикл Херши; *6* — ковалентно замкнутый цикл; *7* — открытый цикл; *8* — катенан; *9* — цикл со сверхвитками; *10* — одиночный разрыв; *11* — пропуск.

перекрутили прежде, чем соединили концы, но при этом убедились, что ни одна из цепей не разорвана), то его называют (равнозначно) *циклом со сверхвитками* или *сверхспиралью*. Число сверхвитков на единицу молекулярной массы называется *плотностью сверхспирали*. Заметим, что если водородные связи в сверхспирали разрушены, то физическими методами нельзя разделить отдельные циклические цепи; однако если в одном из циклов имеется разрыв межнуклеотидной связи, то двухцепочечный цикл можно разделить на две одноцепочечные молекулы, одна из которых линейная, а другая — циклическая.

В двухцепочечном полинуклеотиде разрушенная фосфодиэфирная связь называется одиночным *разрывом* (nisk). Если один или более нуклеотидов пропущены, то это явление называется *пропуском* (gap).

Поперечные связи

Некоторые химические и физические агенты вызывают образование ковалентных связей между двумя нуклеотидами. Такие связи называются *поперечными связями* и могут быть внутри- и межцепочечными: внутрицепочечные поперечные связи препятствуют образованию статистического клубка, а межцепочечные

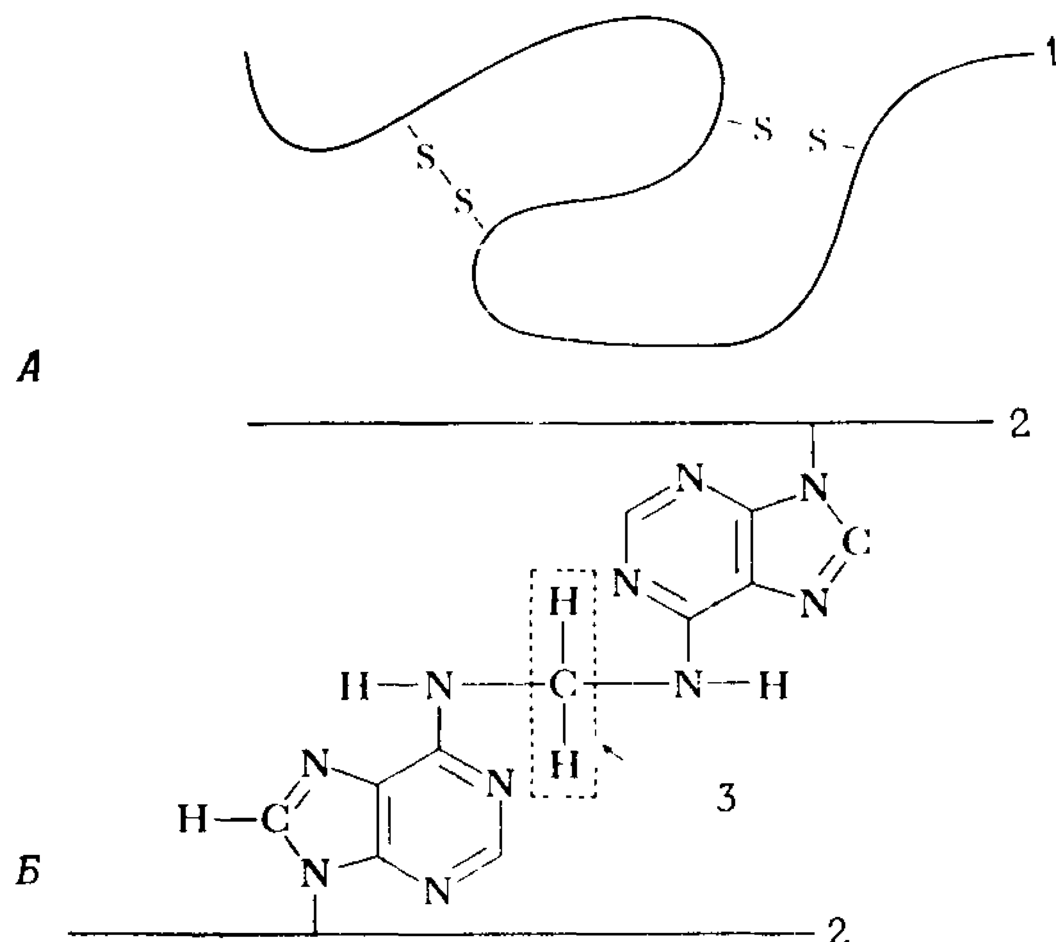


РИС. 1-14.

Два типа поперечных связей.

А — дисульфидный мостик (соединяющий два остатка цистеина) внутри полипептидной цепи; *Б* — метиленовый мостик, образующийся в результате реакции формальдегида с аминогруппами двух адениновых оснований в двухцепочечном полинуклеотиде. *1* — полипептидная цепь; *2* — сахар-фосфатная цепь; *3* — формальдегидная поперечная связь.

поперечные связи — разделению цепей. Ковалентная связь между полинуклеотидом и другой молекулой (например, белком) также называется поперечной связью. В белках имеются природные поперечные связи — дисульфидные мостики (рис. 1-14).

Список литературы

Anfinsen C. B., Principles That Govern the Folding of Protein Chains, Science, **181**, 223—230 (1973).

Bailey J. L., Techniques of Protein Chemistry, American Elsevier, 1967.

Bloomfield V. A., Crothers D. M., Tinoco I., Physical Chemistry of Nucleic Acids, Harper & Row, 1974.

Cantoni G. L., Davies D. R (eds.), Procedures in Nucleic Acid Research, vol. 2, Harper & Row, 1971.

Cold Spring Harbor Laboratory, Structure and Function of Proteins at the Three-Dimensional Level, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, vol. 36, 1972.

Dickerson R. E., Geis I., The Structure and Action of Proteins, Harper & Row, 1969. Прекрасное руководство для начинающих.

Flory P., Principles of Polymer Chemistry, Cornell University Press, 1953. Классическая теоретическая монография.

Haschemeyer R. H., Haschemeyer A. E. V., Proteins: A Guide to Study by Physical and Chemical Methods, Wiley, 1973.

Mandelkern L., An Introduction to Macromolecules, Springer-Verlag, 1972.

Тенфорд К., Физикохимия полимеров, Химия, М., 1961. Подробное изложение теории.

Tanford C., Protein Denaturation, Advan. Protein Chem., **24**, 1—95 (1970).

Wold F., Macromolecules: Structure and Function, Prentice-Hall, 1971.

Задачи

1-1. Полинуклеотид poly(AT), одноцепочечный сополимер с чередующейся AT-последовательностью, означает, что последовательность оснований в цепи АТАТАТА... . Какой тип структуры может иметь этот полинуклеотид в растворе?

1-2. В белке имеется шесть остатков цистеина. Если все они дают дисульфидные мостики и если могут быть образованы все возможные пары при соединении цистеиновых остатков, сколько различных белков получится?

1-3. Циклы Херши образуются при нагревании линейной ДНК, в которой имеются одноцепочечные липкие концы, до температуры, при которой происходит соединение концов. При очень низкой концентрации ДНК образуются только циклы Херши. Образования каких структур можно ожидать при очень высоких концентрациях ДНК?

1-4. Какая полиаминокислота — полилизин или поливалин — образует более компактную структуру при нейтральных pH? Какой из них будет больше зависеть от pH? Почему?

1-5. Аденин, гуанин, цитозин и тимин плохо растворяются в воде, в то время как нуклеотиды более растворимы. Растворимость оснований увеличивается, если в воду добавлять менее полярные, чем вода, растворители, например метанол или этиленгликоль. Что случится с ДНК, если ее поместить в 100%-ный этиленгликоль?

1-6. Предположим, что вы подвергли гибридизации два белка (как на рис. 1-12, *Б*), каждый из которых состоит из трех одинаковых субъединиц. Сколько различных типов гибридных молекул получится, если субъединицы располагаются линейно? А если треугольником?

1-7. Предположим, что белки в задаче 1-6 являются гексамерами, причем субъединицы образуют шестиугольник. Сколько существует возможных гибридных типов?

1-8. Если белок состоит из четырех одинаковых субъединиц, какие силы могут их удерживать вместе?

1-9. Если одноцепочечный полинуклеотид с последовательностью $^{5'}$AGCTAACGGGA$^{3'}$ смешать в условиях гибридизации с другим, с последовательностью $^{3'}$TCGATTAGTCATGCGCT$^{5'}$, какой тип молекулы при этом получится? Предположим, что второй полинуклеотид имеет последовательность $^{3'}$TCGATTAGTACTGCGCT$^{5'}$. Нарисуйте структуру образующегося комплекса.

1-10. Вычислите количество фракции ^{14}N—^{15}N-ДНК (гибридной), получающейся при денатурации и ренатурации смеси 1 ч. ^{14}N-ДНК и 3 ч. ^{15}N-ДНК.

1-11. Напишите структуру гексапептида NH_2-глицил-триптофанил-пролил-изолейцил-валил-метионил-COOH Сколько в нем пептидных связей?

I ЧАСТЬ

НЕПОСРЕДСТВЕННОЕ НАБЛЮДЕНИЕ

ГЛАВА 2

Оптическая микроскопия

Довольно часто биохимики и молекулярные биологи забывают, что изучаемые химические и физические системы, а также молекулы и макромолекулы локализованы в клетках. Микроскопические наблюдения не только интересны и позволяют непосредственно увидеть клетки, но и дают количественную информацию, особенно в сочетании с поляризацией, интерференцией и флуоресценцией. Однако микроскоп со множеством линз, диафрагм и винтов может показаться очень сложным прибором. В данной главе будет сделана попытка помочь читателю разобраться в устройстве, работе и использовании некоторых типов микроскопов.

Основы теории микроскопии

Теория получения изображения с помощью линз может быть представлена с точки зрения либо геометрической, либо физической оптики. Геометрическая оптика хорошо объясняет фокусирование и аберрацию, однако для понимания, почему изображение не совсем четкое и как получается контрастность, необходимо привлечь физическую оптику.

Теория геометрической оптики представлена в многочисленных руководствах (см. список литературы в конце главы), поэтому здесь мы остановимся на ней очень коротко. В геометрической оптике существует два правила, которые следует постоянно помнить: 1) свет распространяется по прямой и 2) луч отклоняется от прямой (преломляется) на границе раздела между двумя прозрачными средами (рис. 2-1).

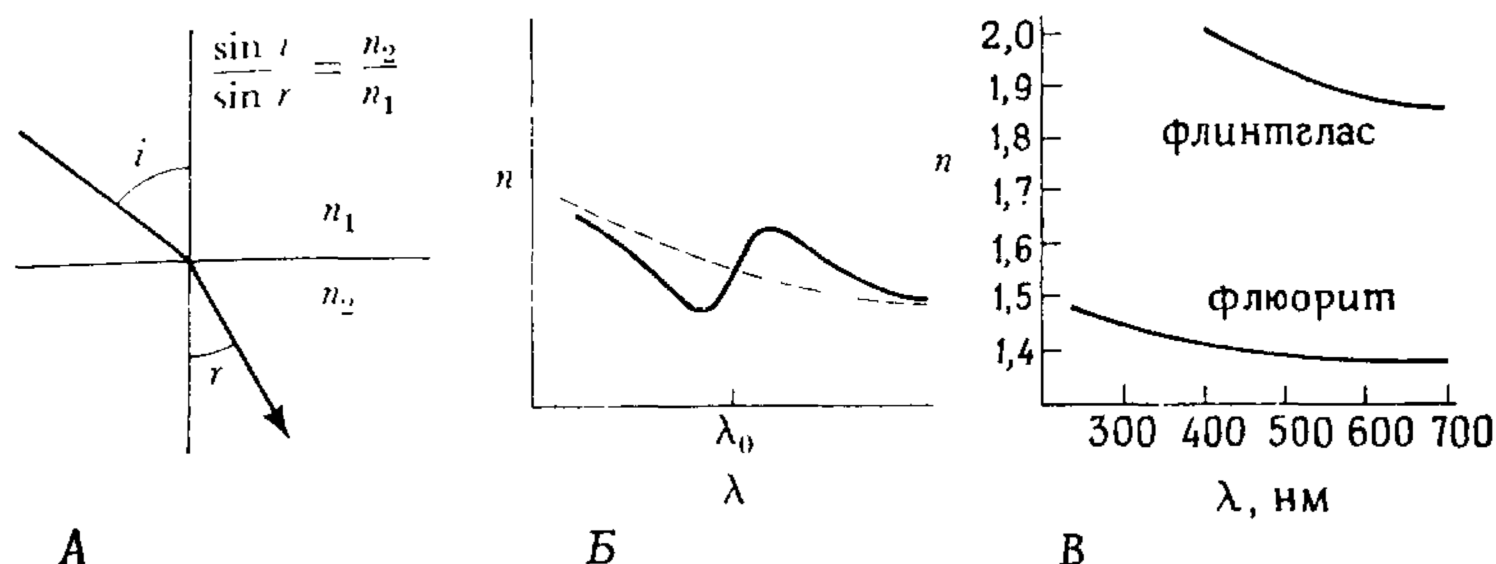


РИС. 2-1.

А — рефракция на поверхности; n_1 и n_2 — показатели преломления по каждую сторону от поверхности; *i* и *r* — углы падения и преломления соответственно. Соотношение между ними описывается приведенным уравнением (закон Снелла). *Б* — зависимость *n* от λ; — — — кривая вдали от максимума поглощения; ——— кривая в относительной близости от максимума поглощения λ_0. *В* — зависимость *n* от λ для двух материалов, используемых для изготовления линз микроскопов.

Идеальная линза с двумя выпуклыми сферическими поверхностями, у которых радиусы кривизны не обязательно одинаковы, имеет две фокусные точки (рис. 2-2). Если две линии, изображающие лучи света, идущие из данной точки к объекту (O), провести таким образом, что один луч будет параллелен оси линзы, а другой пройдет через фокус (F), то они появятся с другой стороны линзы, причем параллельный луч пройдет через фокус (F′), а другой луч будет параллельным оптической оси, как показано на рис. 2-2. Точка пересечения этих лучей и дает положение изображения в точке O′. Это простое построение определяет плоскости объекта и изображения. Расстояния, показанные на рисунке, связаны соотношением $aa'=ff'$, а увеличение изображе-

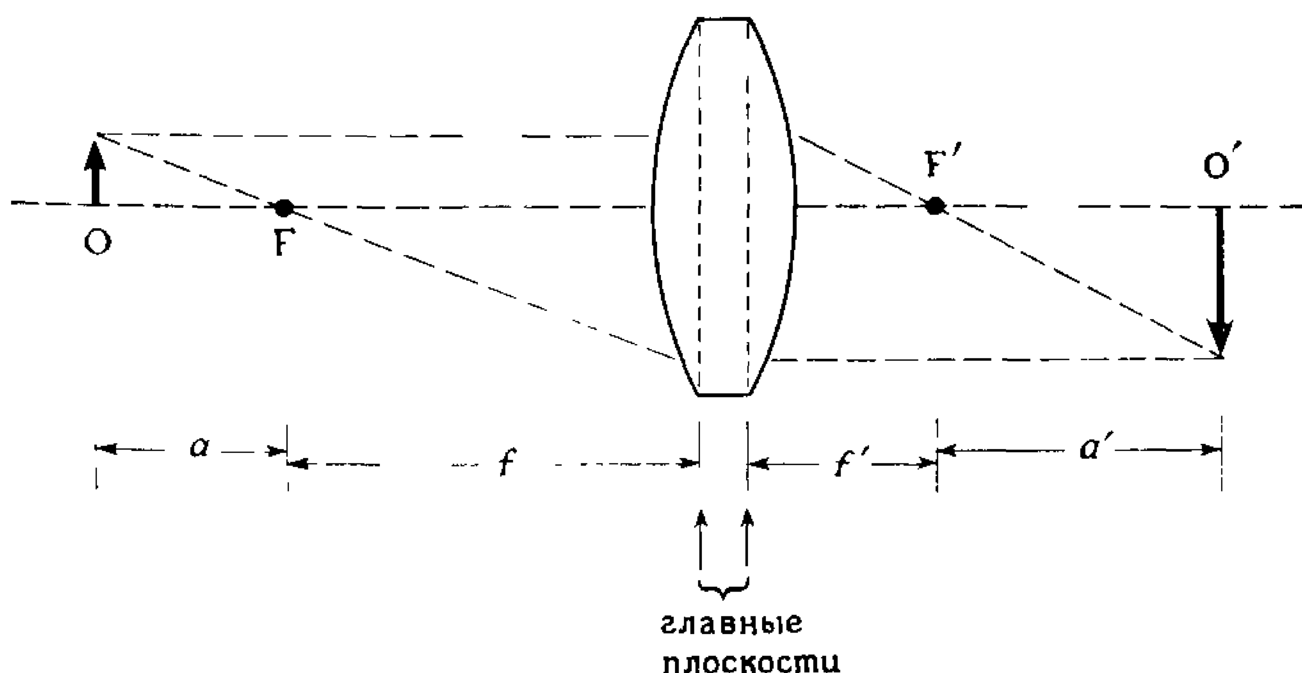


РИС. 2-2.

Образование изображения в простой линзе.

ния равно $-(f/a)$, где знак минус означает, что изображение перевернуто.

Приведенное простое построение справедливо для идеальной линзы. Однако практически не все лучи, выходящие из данной точки объекта, фокусируются в одной точке; это явление называется *аберрацией*. Наиболее простым случаем аберрации является *хроматическая аберрация* (рис. 2-3, *А*). Ее возникновение обусловлено тем, что показатель преломления любого вещества зависит от длины волны преломляющегося света (рис. 2-1), поэтому положение фокуса также зависит от длины волны. Таким образом, вследствие суперпозиции большого числа изображений, из которых не все одновременно находятся в фокусе, изображение в белом свете будет размытым. Проще всего хроматическая аберрация корректируется с помощью системы линз, изготовленных из различных типов стекла, для которых соотношение показателей преломления (n) и длин волн (λ) таково, что n не зависит от λ.

Другие типы аберрации существуют даже при использовании монохроматического света. Главные из них носят название аберраций изображения точки, поскольку они являются следствием

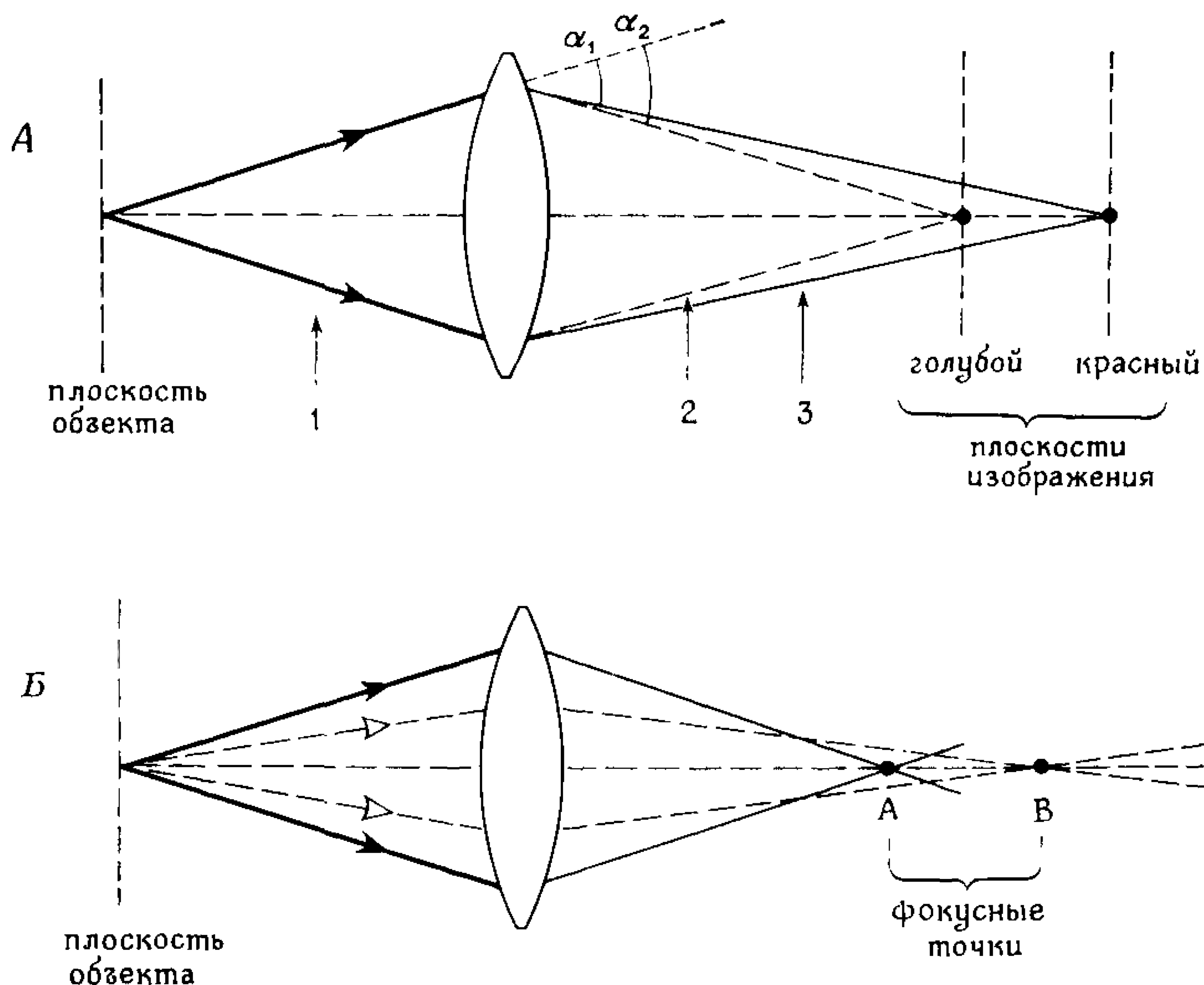


РИС. 2-3.

Два наиболее распространенных вида аберрации простых линз.

А — хроматическая аберрация, при которой положение фокусной точки зависит от длины волны; *Б* — сферическая аберрация, при которой положение фокусной точки зависит от положения части линзы, где происходит преломление, на поверхности линзы. *1* — белый свет; *2* — голубой свет; *3* — красный свет.

того, что все лучи, выходящие из одной точки, не проходят через одну и ту же точку на изображении. Наиболее типична *сферическая аберрация* (рис. 2-3, *Б*), состоящая в том, что лучи, выходящие из одной точки на оптической оси линзы, преломляются в различных частях линзы и поэтому фокусируются в различных точках оптической оси. Вторым важным видом аберрации изображения точки является так называемая *кома*, при которой изображение точки имеет форму кометы, что вызывает постоянное нарушение симметрии изображения объекта. Эти виды аберрации легко корректируются с помощью соответствующих конструкций линз. Такие линзы называются *апланатическими*. Еще одним видом аберрации является *астигматизм*. Если не требуется самого высокого разрешения (как в электронной микроскопии, где это имеет исключительную важность), этот вид аберрации часто не корректируют. В случае необходимости для коррекции применяют линзы, называемые *анастигматами*. Все продающиеся микроскопы подвергаются коррекции на аберрацию перед их установкой.

Теория физической оптики объясняет получение изображения и пределы разрешения; важность последнего будет обсуждаться в разделе, посвященном фазово-контрастной микроскопии. В основе физической оптики лежит представление о свете не как о лучах, движущихся по прямой линии, а как об электромагнитных волнах, которые подвергаются дифракции на отверстии и на кромке и могут интерферировать с усилением или гашением. Так как линза в принципе является отверстием, свет, проходящий через нее, будет подвергаться дифракции. Это приводит к тому, что освещенная точка на объекте будет появляться в плоскости изображения в виде кружка, который к тому же окружен серией широких концентрических колец, являющихся результатом усиливающей интерференции. В микроскопии эти кольца носят название *дисков Айри* (рис. 2-4, *А*). Установлено, что радиус первого темного кольца вокруг центрального диска равен $0{,}61\ \lambda/n\ \sin U$, где λ — длина волны света, n — показатель преломления линзы на стороне, обращенной к объекту, а U — угол между осью линзы и линией, проведенной из точки пересечения плоскости объекта с осью линзы до кромки отверстия (рис. 2-4, *Б*). Это приводит к тому, что две точки на объекте, расположенные близко друг от друга, будут выглядеть на изображении как два тонких диска, поэтому разрешение этих точек (т. е. способность однозначно определить, что это действительно две точки) зависит не только от разделения этих точек на изображении в соответствии с принципами геометрической оптики, но и от размеров получающихся тонких дисков. Положение, при котором разрешение пропадает, точно определить невозможно (рис. 2-4, *В*). В связи с этим с давних пор было принято, что предел разрешения равен $0{,}61\ \lambda/n\ \sin U$. С уменьшением длины волны разрешение повыша-

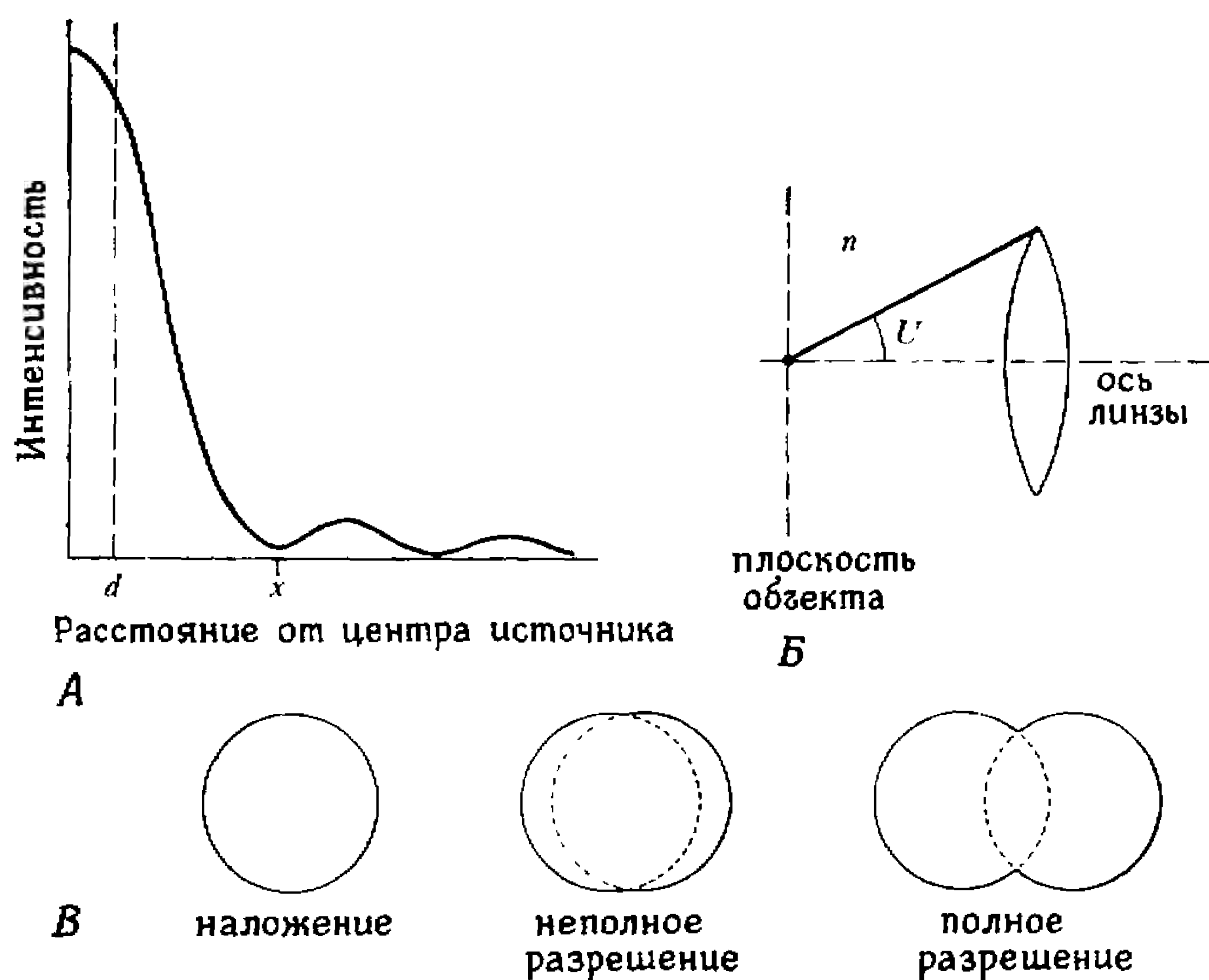


РИС. 2-4.

А — зависимость интенсивности света, испускаемого источником света диаметром *d*, от расстояния. Изображение представляет собой яркое центральное пятно, окруженное светлыми кольцами (диск Айри). Чем меньше становится *d*, тем больше значение *x*. Величина центрального участка в основном определяет разрешение близко расположенных точек. При уменьшении *d* значение *x* также уменьшается, что приводит к улучшению разрешения с уменьшением длины волны. *Б* — изображение угла *U*. *В* — разрешение двух точечных объектов.

ется; к этому же приводит увеличение и *n*, и *U*, причем для увеличения *U* нужно либо уменьшить расстояние от объекта до линзы, либо увеличить диаметр линзы. (К этому мы вернемся ниже.) Величина *n* sin *U* называется *числовой апертурой.* Эта величина всегда обозначается на объективах микроскопов буквами NA (от английского numerical aperture). Увеличение разрешения при увеличении угла *U* можно объяснить следующим образом. Когда свет попадает на объект, он подвергается дифракции самим объектом. Дифракционные полосы различных порядков будут выходить из точки объекта под различными углами, которые увеличиваются с увеличением порядка дифракции. Если каждую полосу дифракции рассматривать как носитель части информации для получения изображения объекта, то максимум информации может быть получен в том случае, когда будет собран весь свет, подвергшийся дифракции. Отсюда ясно, что желательно иметь максимальный угол сбора между объектом и отверстием линзы, т. е. большое значение угла *U*.

Устройство микроскопа

Микроскоп состоит из трех основных частей: источника света с постоянной яркостью, предметного столика и увеличивающих линз с коррекцией различных видов аберрации. Однако для получения очень большого увеличения фокусное расстояние должно быть небольшим и глаз должен находиться практически на противоположной стороне линзы. Чтобы избежать трудностей, связанных с изготовлением линз с очень коротким фокусным расстоянием с введением коррекции, позволяющей глазу находиться на доступном расстоянии от линзы, вводят дополнительную систему линз, называющуюся *окуляром*. Основная система линз (линзы объектива) вместе с окуляром составляет *основу микроскопа* (рис. 2-5). Объект помещают чуть дальше фокусной плоскости объектива. При этом увеличенное (10—100×) и перевернутое изображение образуется за точкой фокуса со стороны получения изображения. Окуляр несколько увеличивает это изображение (2—20×) и фокусирует его на сетчатке глаза, которая находится на удобном для работы расстоянии.

Линзы объектива

Объективы микроскопов, как правило, тщательно стандартизируются по увеличению NA. В табл. 2-1 приведены некоторые параметры типичных объективов, а на рис. 2-6 изображены схемы устройства двух типичных объективов: 40× «сухой» и 100× с масляной иммерсией. Заметим, что в общем случае, чем больше увеличение, тем больше NA, поэтому увеличение не является «свободным». (Свободное увеличение соответствует тому, что увеличение всегда возрастает по мере роста числа линз, однако если при этом разрешение не увеличивается, то в результате ничего не происходит.) Обычно NA увеличивается с уменьшением фокусного расстояния, поскольку увеличение растет с уменьшением диаметра линз. Для линз с большим NA (например, 1,30)

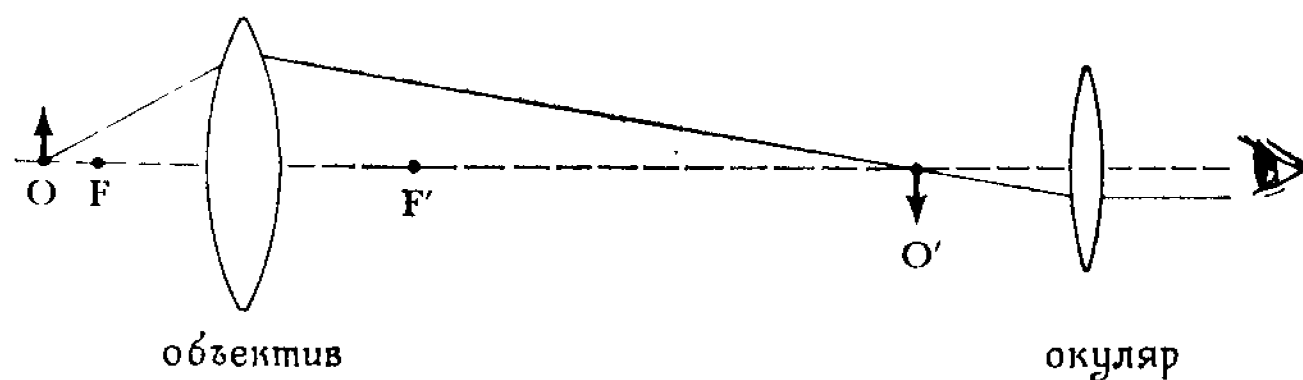


РИС. 2-5.

Схема оптики микроскопа.

F и F' — фокусные точки объектива.

ТАБЛИЦА 2-1

Свойства линз объективов

Увеличение	NA	Фокусное расстояние, мм	Рабочее расстояние, мм[а]	Диаметр поля, мм
10	0,25	16	5,50	2,00
20	0,54	8	1,40	1,00
40	0,65	4	0,60	0,50
40	0,95	4	0,25	0,20
95[б]	1,32	2	0,10	0,05

[а] Расстояние от передней поверхности линзы до образца.
[б] Линзы с масляной иммерсией.

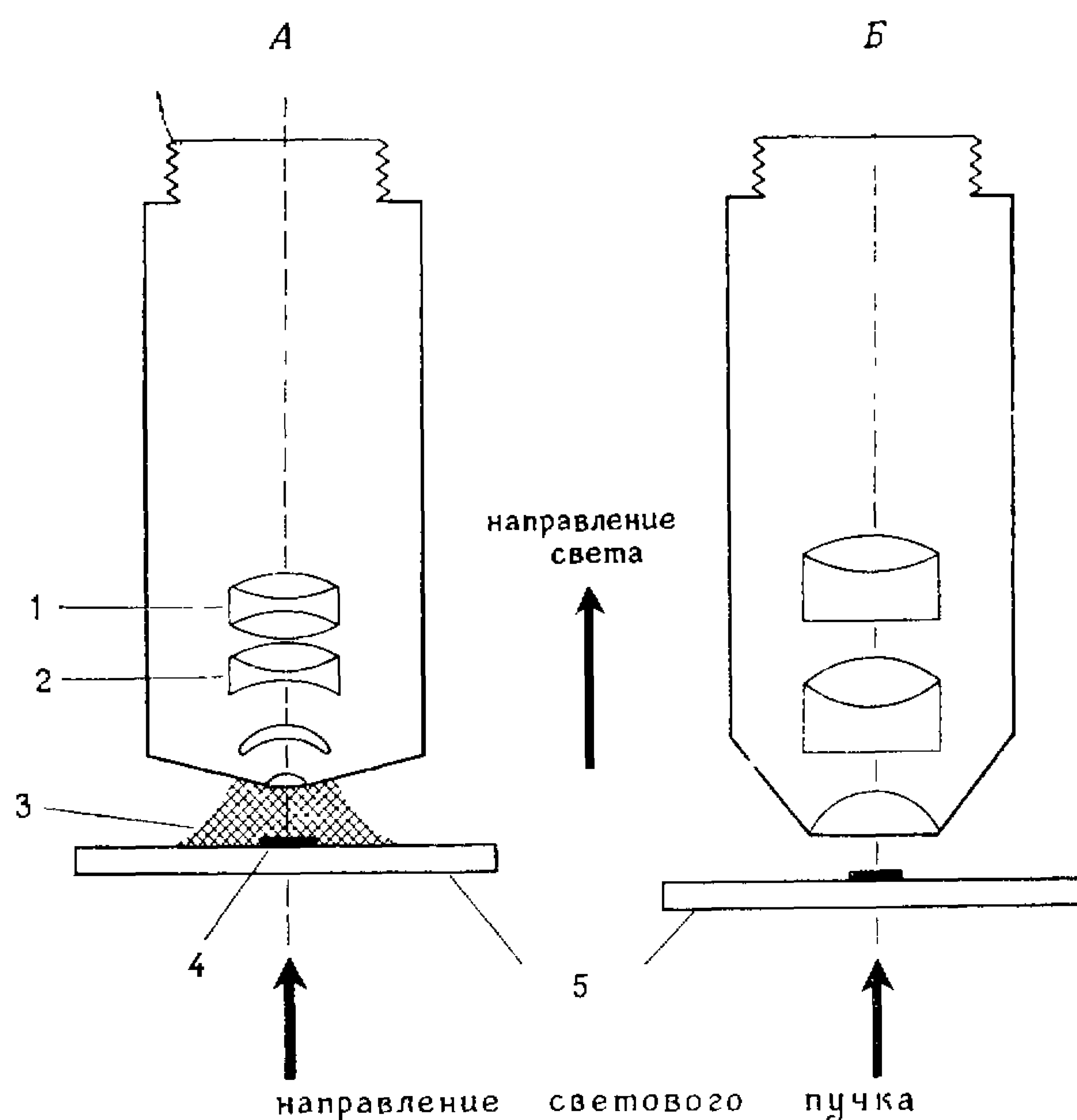


РИС. 2-6.

Типичные объективы, содержащие несколько линз для коррекции различных видов аберрации.

А — 100× иммерсионного типа; *Б* — 40×. *1* — триплет; *2* — дублет; *3* — иммерсионное масло; *4* — образец; *5* — предметное стекло.

это связано с помещением образца внутри линзы. Здесь на помощь приходит так называемый объектив с масляной иммерсией. Использование масла с показателем преломления таким же, как у покровного стекла и передней линзы объектива, позволяет исключить влияние всех поверхностей между объектом и объективом (рис. 2-6). Передняя линза объектива с масляной иммерсией обычно имеет почти сферическую форму, поэтому при наличии слоя масла объект оказывается как бы внутри сферической линзы. В результате дифракция всего света происходит в прямом направлении.

Многие линзы с масляной иммерсией имеют остаточную хроматическую аберрацию, поэтому они дают для голубого изображения увеличение в 2 раза больше, чем для красного. Это служит предметом ряда критических работ и может быть устранено с использованием *компенсирующего окуляра* с цветовой коррекцией (см. следующий раздел) в сочетании с объективом, который вносит частичную коррекцию и называется *апохроматом* *. Однако наилучшим решением всех проблем, возникающих в связи с цветовыми неоднородностями, служит использование монохроматического освещения.

Небольшую аберрацию, называющуюся *искривлением поля* (длинные прямые линии становятся искривленными), обычно не корректируют, так как на практике чаще всего приходится работать с небольшими участками. Однако искривление поля может быть серьезной помехой при микрофотографировании, поскольку здесь обычно работают с большими поверхностями. В таких случаях используют *объективы плоской поверхности,* однако они дороги и их стоит применять только в тех случаях, когда приходится часто иметь дело с микрофотографированием.

Окуляры

Основная функция окуляра состоит в передаче изображения от объектива глазу. Существуют разнообразные системы окуляров: Рамсдена (рис. 2-7), Гюйгенса, Кельнера и компенсирующие. Три первых типа взаимозаменяемы и отличаются только способом нанесения сеток, указателей и других точек отсчета. Компенсирующий окуляр разработан для коррекции хроматической аберрации. Окуляры Рамсдена и Гюйгенса состоят из двух линз, закрепленных на противоположных концах тубуса. Окуляры

* Для получения апохроматических объективов некоторые линзы изготовляют из CaF_2 (флюорита), поскольку он имеет самый большой *n* и позволяет получить немного большее значение NA (1,35). Однако такие линзы очень дороги, обладают флуоресценцией (их нельзя использовать для флуоресцентной микроскопии) и рассеивают свет, поэтому для них нужны специальные типы освещения.

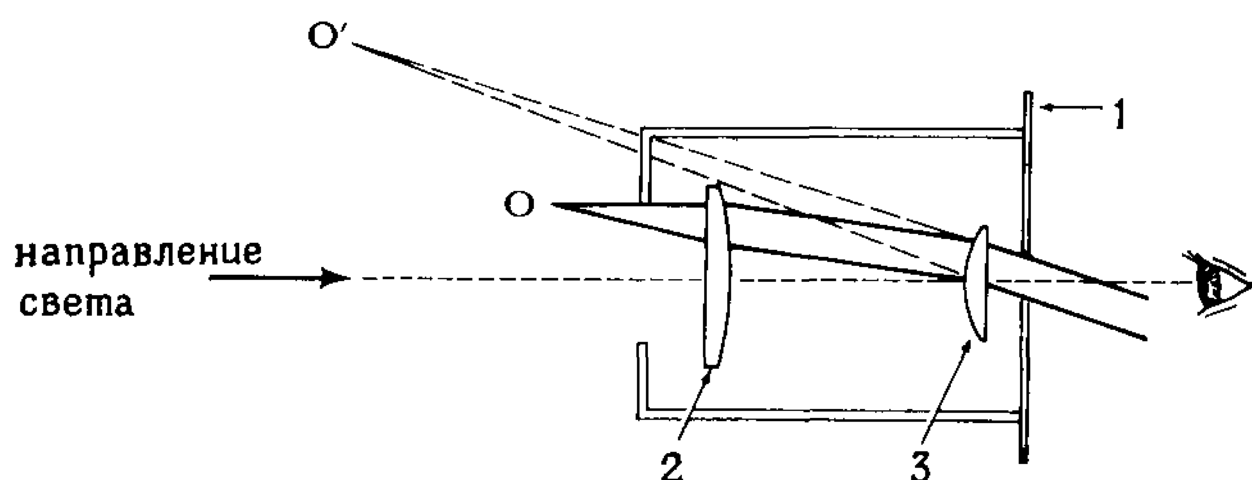


РИС. 2-7.

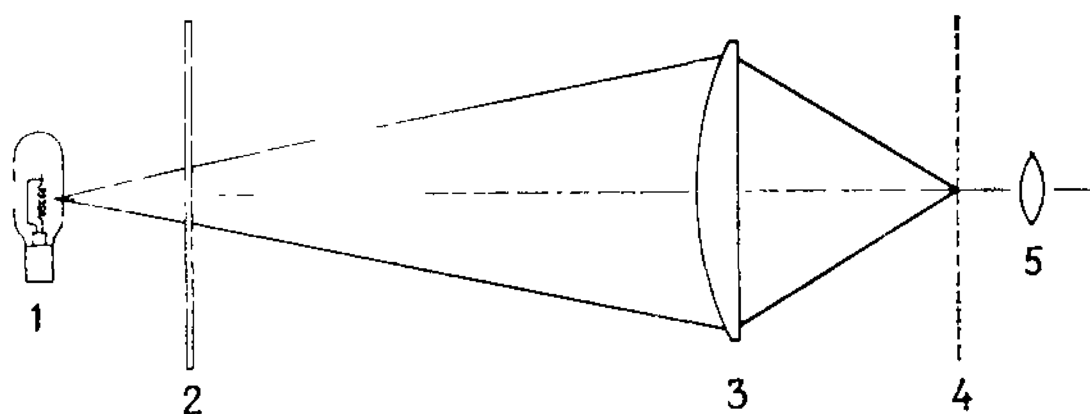
Окуляр Рамсдена. Изображение О, получаемое объективом, увеличивается с образованием окончательного изображения в точке О'.

1 — оправа окуляра; *2* — линза поля; *3* — глазная линза.

Кельнера и компенсирующий отличаются тем, что одна из линз представляет собой дублет, полученный при склеивании двух линз. Окуляры дают увеличение в пределах от 5 до 20. Однако необходимо постоянно помнить, что рост увеличения без повышения разрешения не имеет смысла и диапазон увеличения окуляров служит для удобства наблюдения, т. е. 40× объектив с окуляром 5× даст большее разрешение, чем 10× объектив с окуляром 20×, поскольку 40× объектив обладает бóльшим NA, а разрешающая способность определяется исключительно объективом.

Конденсорные линзы

Для обычной микроскопии освещение объекта должно отвечать двум условиям: во-первых, луч света должен иметь расходимость пучка на выходе из плоскости объекта не менее угла U, для того чтобы можно было полностью использовать разрешающую способность объектива (как говорят специалисты в области микроскопии, падающий луч должен «заполнить числовую апертуру» объектива); во-вторых, освещение образца должно быть равномерным по всей его площади, причем для удобства необходима возможность контроля интенсивности и отсеивания рассеянных лучей. Для достижения последнего применяют источник света небольшого размера, свет от которого фокусируется на очень маленькой площади с помощью системы линз, смонтированных вместе и называемых *конденсором*, который действует как объектив, обращая луч света. Аберрации конденсора, как правило, не корректируют так тщательно, как в случае объектива, поскольку разрешающая способность объектива почти не зависит от небольших аберраций конденсора. Существует три вида конденсоров: Аббе и апланатический (применимые для любых практиче-



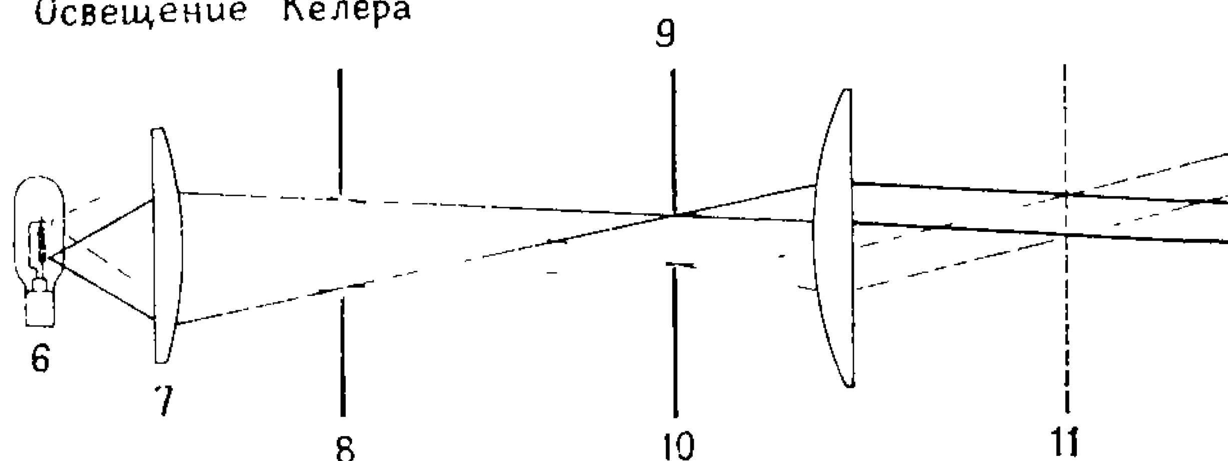


РИС. 2-8.

Типы освещения, используемые в микроскопии.

1 — источник света; 2 — матовое стекло; 3 — конденсор; 4 — плоскость объекта микроскопа; 5 — объектив; 6 — лампа накаливания; 7 — полевая линза; 8 — полевая диафрагма; 9 — промежуточная диафрагма; 10 — задняя фокусная плоскость конденсора; 11 — плоскость объекта.

ских целей) и ахроматический (улучшает цветовую коррекцию).

Вероятно, наибольшее число недоразумений при работе с микроскопом вызывает регулировка конденсора. Конденсор используют для получения либо *критического освещения*, либо *освещения Кёлера* (рис. 2-8, *А*). В критическом освещении свет источника фокусируется конденсором так, чтобы объект освещался конусом света. На практике это означает, что положение конденсора относительно объекта регулируется таким образом, что пятно освещающего света должно быть по возможности наименьшим, если смотреть невооруженным глазом, и возможно более ярким, если смотреть через окуляр и объектив, *сфокусированный на объекте*. Критическое освещение используют очень широко; оно требует наличия перед источником рассеивающего экрана, чтобы избежать получения на объекте изображения нити накаливания источника света. Этот метод иногда приводит к излишним затратам света, однако он очень прост. Линзы конденсора выбираются таким образом, чтобы их значение NA было не меньше, чем у объектива, для того, чтобы заполнить апертуру объектива.

Освещение Кёлера более интенсивно и допускает более точный контроль. Между конденсором и источником света помеща-

ется дополнительная линза, называемая полевой линзой (рис. 2-8, *Б*), которая дает изображение в том случае, когда источник находится в фокусной плоскости конденсора, в действительности в фокусной точке. Все лучи света после конденсора являются параллельным пучком. Они проходят через объект под различными углами, которые возрастают с увеличением расстояния точек источника от оптической оси. Таким образом, объект освещается набором пучков, составляющих световой конус *. Конденсор можно отрегулировать таким образом, что изображение полевой линзы будет находиться в плоскости объекта, а изображение лампы — на задней фокусной плоскости объектива. Этого достигают уменьшением полевой диафрагмы (рис. 2-8, Б) и фокусированием ее на объекте с помощью конденсора. При этом по-

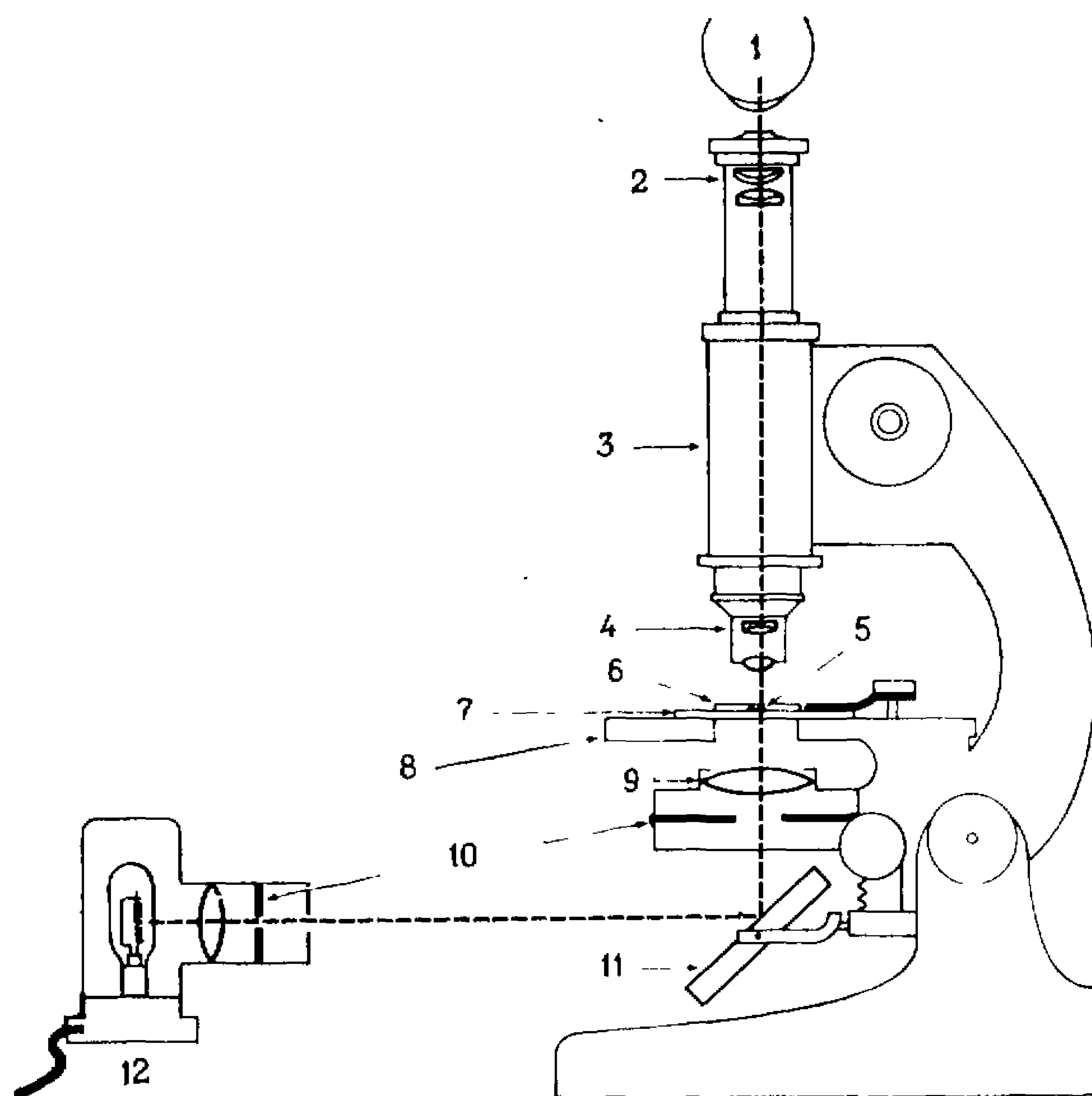


РИС. 2-9.

Устройство микроскопа. Тубус и конденсор могут независимо двигаться вдоль оптической оси для фокусировки.

1 — глаз; *2* — окуляр; *3* — тубус; *4* — объектив; *5* — образец; *6* — покровное стекло; *7* — стеклянная пластинка; *8* — столик; *9* — конденсор; *10* — апертура; *11* — зеркало; *12* — лампа.

---

* В действительности это не конус, так как нить накаливания лампы не круглая. Однако размер и положение полевой диафрагмы позволяют использовать в качестве источника только малую часть нити лампы.

лучается освещение такое же, как и полевой линзы. Конденсор или промежуточную диафрагму обычно добавляют для контроля NA освещающего светового пучка.

Полная схема типичного микроскопа показана на рис. 2-9.

Регулировка микроскопа

Для подготовки микроскопа к работе необходимо провести следующую регулировку: 1) источник света и все его компоненты должны быть отцентрированы по оптической оси прибора; 2) объектив необходимо сфокусировать и 3) требуется отрегулировать освещение. В большинстве обычных (стандартных) микроскопов конденсор, объектив и окуляр коаксиальны, поэтому центрировать требуется только источник света. Это достигается путем фокусировки на микроскопном стекле, удаления окуляра и перемещения источника света с помощью регулировочного винта до тех пор, пока свет (при наблюдении в тубус) не будет находиться в центре объектива. Если регулируется и установка по центру конденсора, то конденсор вначале вынимают, источник света центрируют, как описано выше, затем конденсор ставят на место и с помощью регулировочного винта центрируют по источнику света. Затем конденсор фокусируют на объекте для критического освещения или, как обсуждалось выше, для освещения Кёлера. Промежуточная диафрагма (рис. 2-8, *Б*) должна быть постоянно отрегулирована таким образом, чтобы NA линзы была заполнена; это можно установить, если из тубуса вынуть окуляр и посмотреть, полностью ли освещен объектив. Для того чтобы избежать влияния рассеянного и отраженного света, полевую диафрагму следует уменьшить так, чтобы освещен был только объект. Если интенсивность освещения мешает удобному наблюдению, то ее можно уменьшить. Для уменьшения интенсивности ни в коем случае нельзя изменять апертуры, для этого либо вводят перед источником света нейтральные плотные фильтры, либо уменьшают напряжение, подаваемое на источник.

Контраст

Чтобы объект был видимым, его изображение должно отличаться по интенсивности от окружающего фона. Различие в интенсивностях объекта и фона называется *контрастом*. К сожалению, большинство биологических образцов (клетки и их компоненты) прозрачны, т. е. их контраст близок к нулю. В прошлом для решения этой проблемы образцы окрашивали, прибавляя окрашенные вещества, которые реагировали с определенными компонентами

клеток. Известны сотни таких веществ, многие из которых преимущественно (хотя абсолютная специфичность встречается редко) реагируют с белками, липидами или нуклеиновыми кислотами. Существуют ли красители, обладающие реальной специфичностью к определенным химическим группам, — это вопрос дискуссионный. Техника окрашивания образцов описана во многих руководствах по микроскопии и гистохимии (см. список литературы в конце главы). Для достижения достаточного контраста и получения количественной информации из данных микроскопии разработано пять специальных методов: метод темного поля, фазово-контрастная, интерференционная, поляризационная и флуоресцентная микроскопия. Ниже мы рассмотрим каждый из этих методов отдельно, а также примеры их использования.

Метод темного поля

Рассмотрим критическое освещение объекта, помня при этом, что свет на выходе из конденсора образует сплошной конус (рис. 2-8, *Б*). Если в плоскости объекта объект отсутствует, то

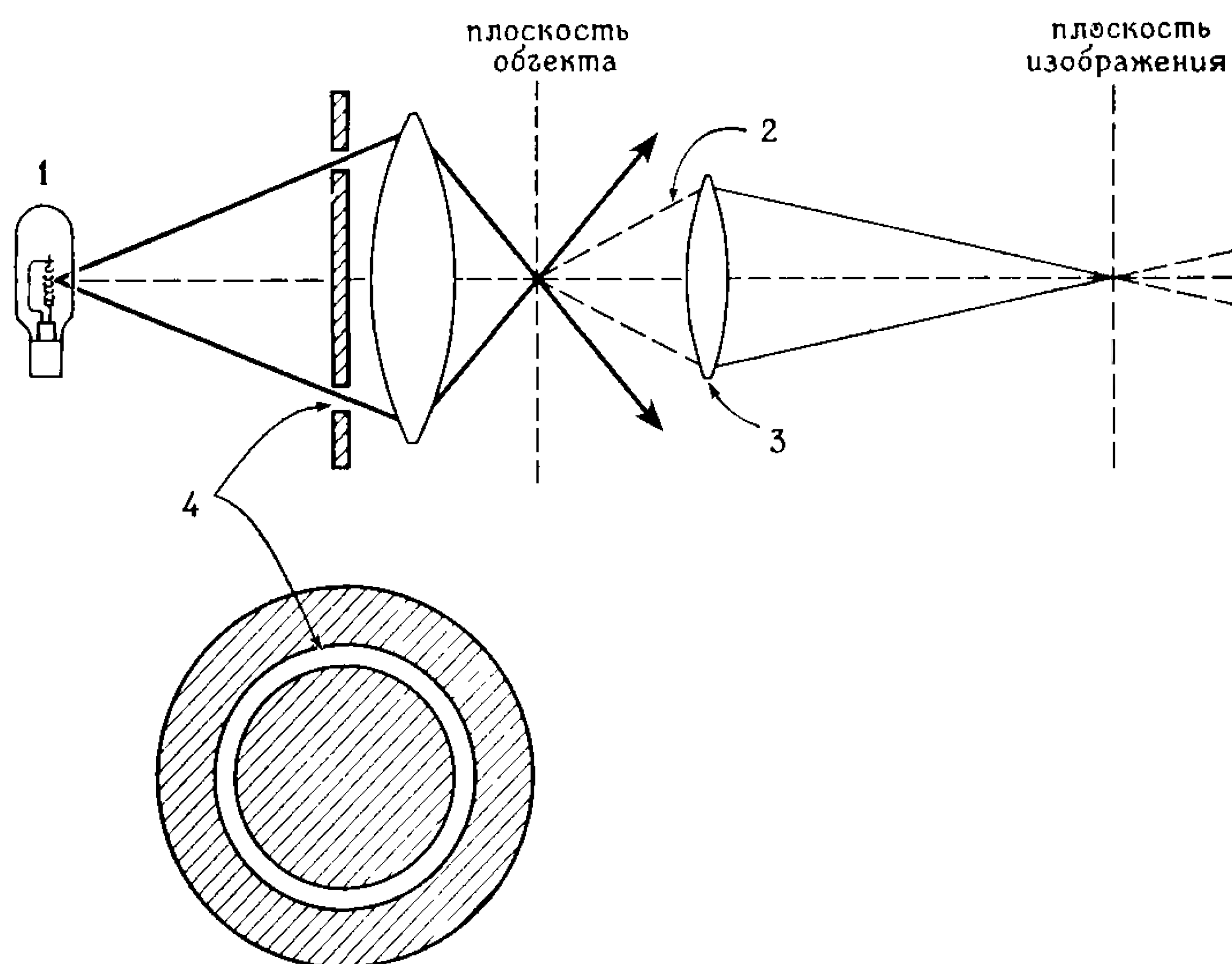


РИС. 2-10.

Оптика в методе темного поля.

1 — источник света; *2* — свет, подвергшийся дифракции; *3* — объектив; *4* — кольцевая апертура (вид снизу).

поле будет равномерно освещенным (светлое поле). Если в конденсор или ниже его ввести непрозрачный диск с прозрачным кольцом (рис. 2-10), то плоскость объекта будет освещена *полым* конусом света, который, пройдя через плоскость объекта, выходит в виде второго полого конуса. Если размер кольца достаточно велик, полый конус будет окружать объектив и при этом свет не будет попадать в объектив; в таком случае поле станет темным. Однако, если объект находится в плоскости объекта, свет на нем будет подвергаться дифракции и некоторые полосы дифракции будут появляться под таким углом, что они попадут в объектив. Хотя интенсивность этого света мала, на темном фоне будет получаться более светлое изображение. Такое изображение содержит малое число деталей (информация теряется за счет отбрасывания света нулевого порядка), однако достигается хороший контраст, причем его можно регулировать изменением интенсивности источника света и степени, в которой удаляются внутренние отражения в системе. Следовательно, метод темного поля полезен при подсвете небольших частиц, которые трудно увидеть на светлом поле. В настоящее время этот метод используется редко вследствие его низкого разрешения. Если данный микроскоп не снабжен приспособлением для проведения наблюдений методом темного поля, то темного поля можно добиться разрегулировкой источника света и конденсатора таким образом, чтобы в объектив свет либо вообще не попадал, либо попадал в малой степени. На рис. 2-11 приведены изображения неокрашенной бактерии, полученные с помощью обычной и фазово-контрастной микроскопии и метода темного поля.

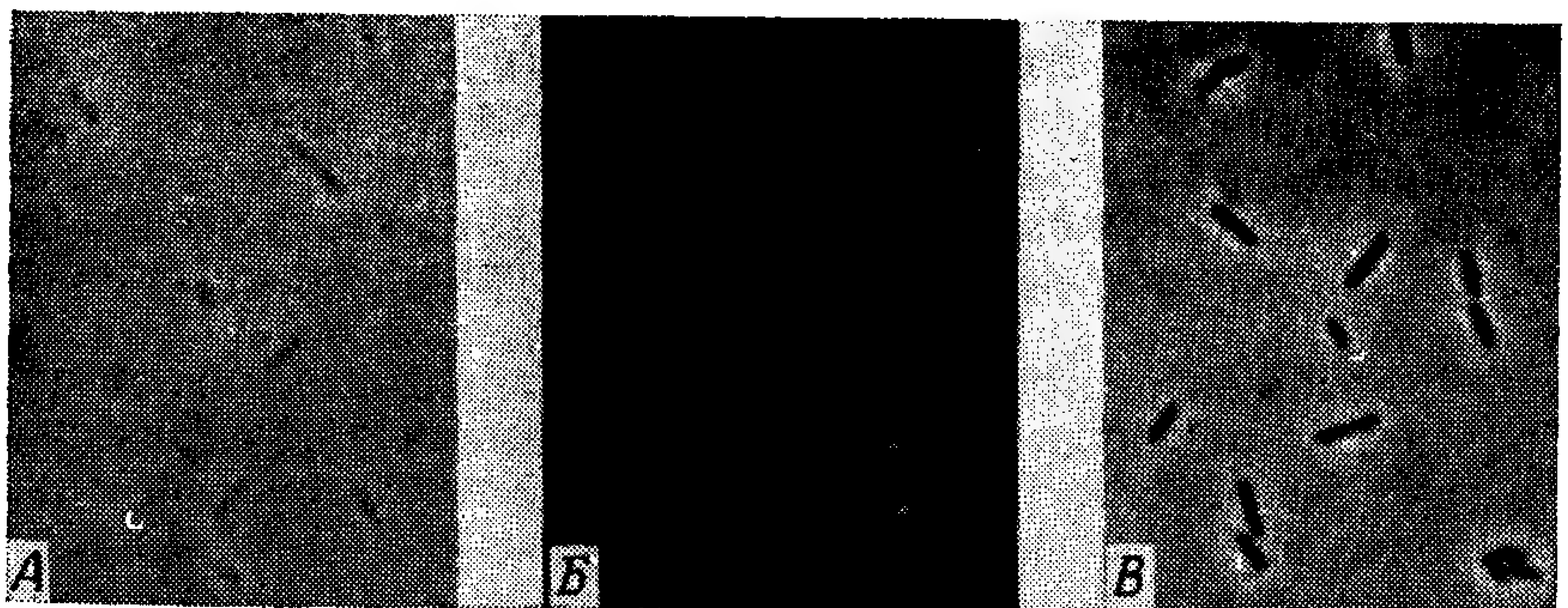


РИС. **2-11.**

Микрофотографии бактерий (*E. coli*) при наблюдении их методами светлого (*А*) и темного (*Б*) поля, а также в фазово-контрастный микроскоп (*В*). Обратите внимание, что на снимке *А* бактерии почти не видны.

Фазово-контрастная микроскопия

Рассмотрим прозрачный диск в прозрачной среде, освещаемый параллельным светом, который падает перпендикулярно плоскости диска. Диск при этом практически невидим, поскольку интенсивность света, проходящего через диск и окружающую его среду, одинакова. Однако свет, проходящий через диск, будет отличаться по фазе от света, проходящего через среду, в том случае, когда показатели преломления диска и среды не совпадают, поскольку световые волны задерживаются при прохождении через прозрачное вещество (гл. 16) *. Однако ни глаз человека, ни фотопленка не могут различить свет, отличающийся по фазе; следовательно, диск остается невидимым.

Если объекты очень малы, то образование изображения не может быть точно описано с позиций геометрической оптики; на самом деле оно является результатом двух дифракционных процессов. Падающий свет сначала испытывает дифракцию на объекте, а затем — на апертуре объектива. Это означает, что каждая точка объекта и каждая точка объектива вносят свой вклад в образование каждой точки изображения путем интерференции всех дифракционных волн.

Рассмотрим теперь свет, попадающий в объектив после того, как он прошел через точку в прозрачном диске. Этот свет главным образом состоит из света, подвергшегося дифракции нулевого порядка, т. е. это прямой луч, который можно назвать *неотклоненным светом*. Свет, подвергшийся дифракции, образует максимумы под различными углами к волнам нулевого порядка, поэтому его можно назвать *отклоненным светом*. Он отличается по фазе от неотклоненного на одну четверть длины волны. Свет, проходящий через среду, также разделяется на отклоненный и неотклоненный. Однако все эти волны рекомбинируют в объективе и проецируются на плоскость изображения, давая изображение за счет взаимодействия волн, находящихся в различных фазах.

В фазово-контрастной микроскопии различие фаз можно преобразовать в различие интенсивностей с помощью простого приема (рис. 2-12). В фокусной плоскости под конденсором помещается кольцевая апертура (такая же, как в методе темного поля),

* Важно четко представлять употребляемое здесь понятие фазы. Если две синусоидальные волны движутся вдоль оси в одном направлении и имеют максимумы и минимумы в одних точках, то говорят, что они находятся в фазе. Если максимум одной волны совпадает с минимумом другой, они находятся друг от друга на расстоянии в половину длины волны, или 180°, при этом волны находятся в противофазе и при наложении взаимно уничтожаются.

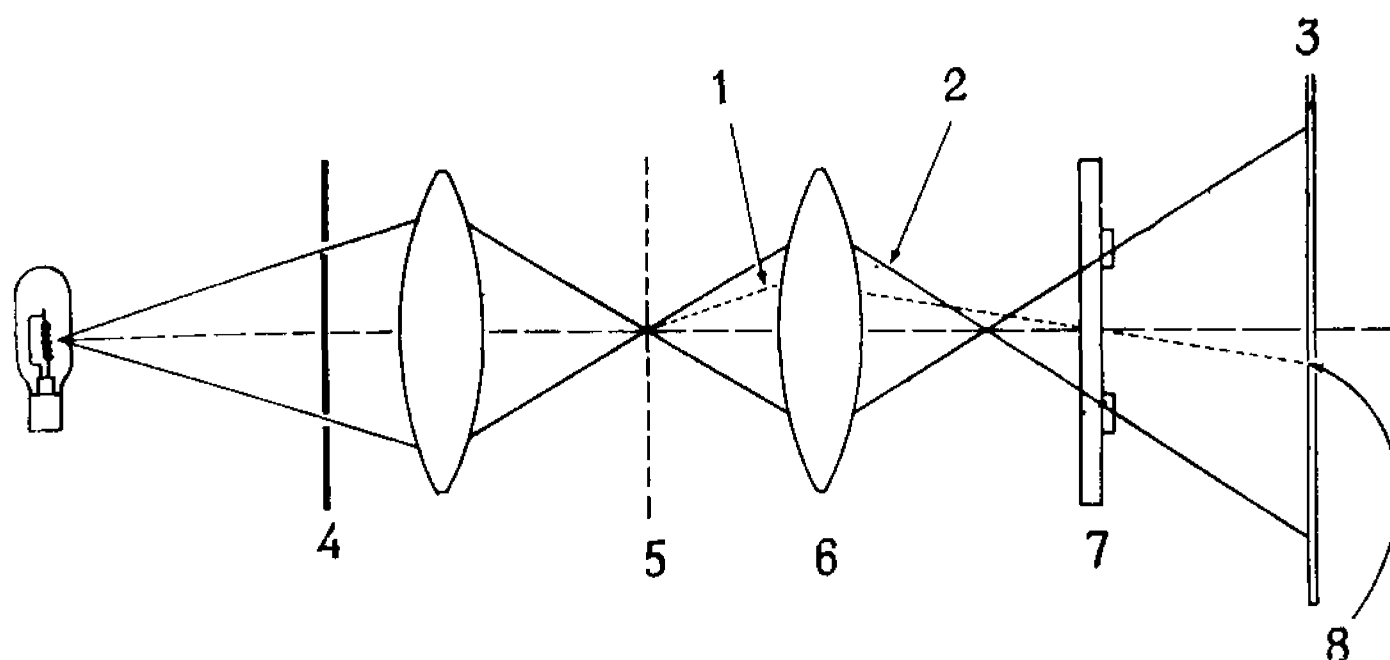


РИС. 2-12.

Оптика фазово-контрастного микроскопа.

1 — отклоненный свет; 2 — неотклоненный свет; 3 — плоскость изображения (освещена неотклоненным светом, сдвинутым по фазе); 4 — кольцевая апертура (фазовое кольцо); 5 — плоскость объекта; 6 — объектив; 7 — фазовая пластинка; 8 — интерференция.

в результате чего объект освещается *полым* конусом света. Если объект отсутствует, полый конус света проходит через плоскость объекта и попадает в объектив с образованием маленького светового кольца. На задней фокусной плоскости объектива (со стороны окуляра) конденсор образует кольцевое изображение. В этой точке устанавливают *фазовую пластинку,* состоящую из диска с кольцевой канавкой глубиной в одну четверть длины волны или с дополнительным слоем, толщиной также в одну четверть длины волны. Обычно для создания дополнительного слоя применяют прозрачную пленку, прикрепляемую прямо на поверхность одной из линз объектива. Размер фазовой пластинки точно совпадает с размером изображения кольца конденсора. Таким образом, весь свет, проходящий через кольцо конденсора, будет отставать или опережать на одну четверть длины волны в зависимости от того, снабжена фазовая пластинка канавкой или дополнительным слоем. Если теперь взять объект, на котором происходит дифракция падающего света, то становится ясным, что свет нулевого порядка (неотклоненный) будет проходить через фазовую пластинку, тогда как свет, подвергшийся дифракции (выходящий под углом или отклоненный), будет проходить через остальную апертуру объектива. Кроме того, чтобы сделать близкими интенсивности отклоненного и неотклоненного света (свет нулевого порядка всегда более интенсивен, чем свет высших порядков), на фазовую пластинку можно поместить тонкую пленку из алюминия или серебра (не изменяющую фазу, но только задерживающую свет).

При рекомбинации отклоненного и неотклоненного света в объективе они различаются по фазе на половину длины волны —

условие, при котором происходит гасящая интерференция. Таким образом, фон выглядит темным, а действительная интенсивность зависит от относительной интенсивности отклоненного и неотклоненного света (это определяется толщиной пленки алюминия на фазовой пластинке). При наличии объекта свет состоит из двух компонентов — проходящего через объект и проходящего через среду, причем свет, отклоняемый объектом, будет интерферировать с гашением только с неотклоненным светом в одном и том же положении плоскости изображения. Вспомним, что объект сам по себе вызывает различие в фазах, поскольку его показатель преломления отличается от показателя преломления среды. Это различие фаз при наложении различия, вызываемого фазовой пластинкой, приводит к исчезновению гасящей интерференции. Следовательно, объект будет выглядеть более ярким, чем фон. (Если неотклоненный свет опережает отклоненный на одну четверть длины волны, то объект будет выглядеть темным на светлом фоне.) Ясно, что степень потемнения каждого объекта зависит от его показателя преломления и толщины.

Этот простой способ позволяет сделать видимыми «невидимые» объекты. Единственным недостатком фазово-контрастной микроскопии по сравнению с интерференционной (см. следующий раздел) является неизбежный ореол, которым окружен объект. Это обусловлено дифракцией на фазовой пластинке. На рис. 2-13 (см. также рис. 2-11) наглядно видна разница в микрофотогра-

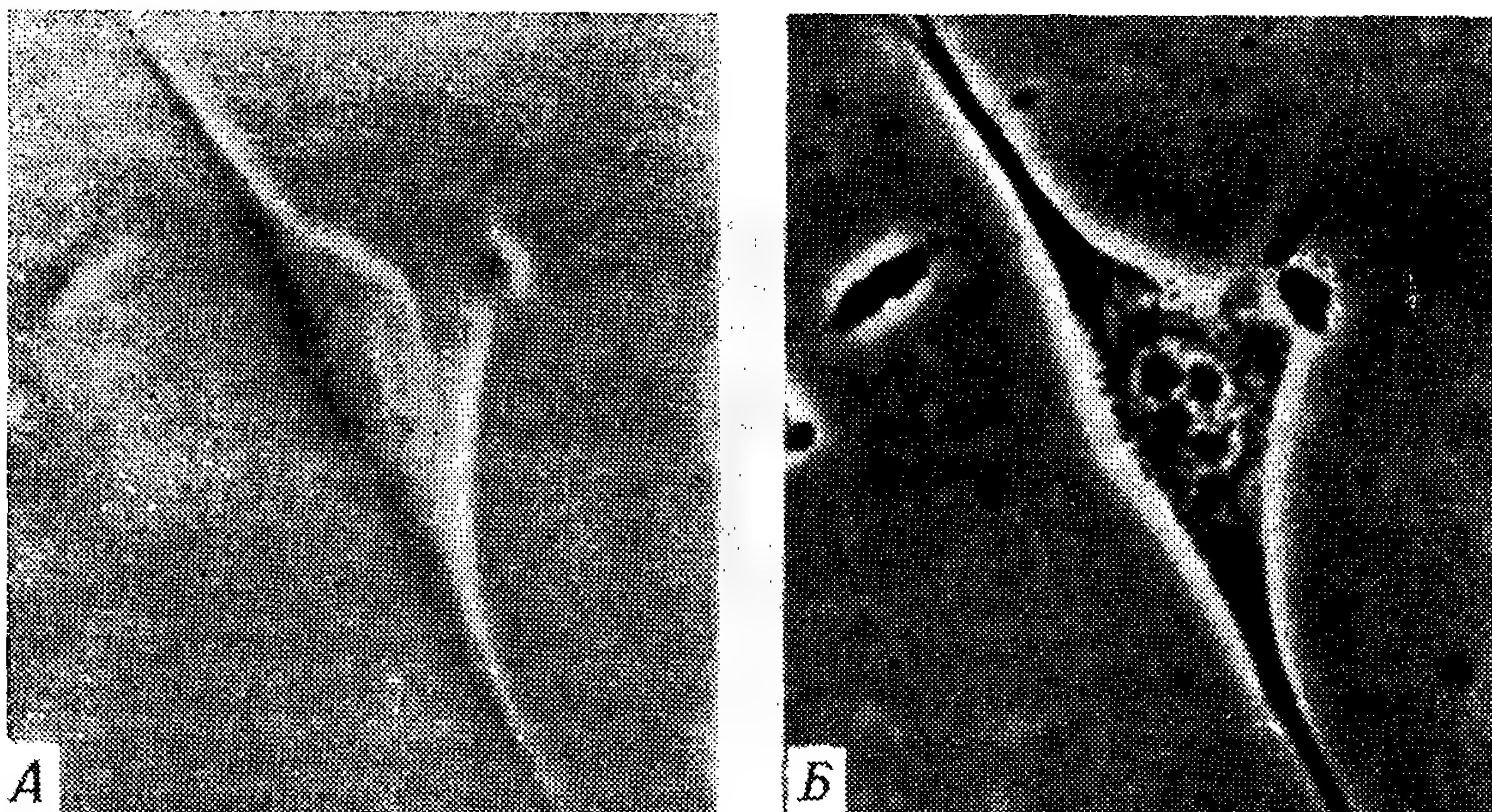


РИС. 2-13.

Микрофотографии фибробласта мыши, полученные методом светлого поля (*А*) и фазово-контрастным методом (*Б*). Обратите внимание на существенно лучший контраст на снимке *Б*.

фиях одной и той же клетки, полученных методом светлого поля и фазово-контрастным методом.

Регулировка фазово-контрастного микроскопа очень сложна, поскольку при этом должны удовлетворяться не только все требования обычной микроскопии, но, кроме того, кольцо конденсора должно находиться точно по центру и фокусироваться на фазовой пластинке. Метод регулировки описан в приложении к этой главе.

Применение фазово-контрастной микроскопии

К образцам в фазово-контрастной микроскопии предъявляется лишь одно требование — должно отсутствовать поглощение, поскольку метод основан только на различиях фаз. Для поглощающих объектов (например, окрашенных клеток) различие в интенсивностях будет складываться с фазовыми эффектами и часто приводит к понижению контраста и плохому качеству изображения.

Фазово-контрастная микроскопия имеет большое значение для наблюдения органелл живых клеток (рис. 2-13). Ядра сильно контрастируют с цитоплазмой, и компоненты цитоплазмы, такие, как митохондрии, вакуоли и капельки жира, хорошо видны. Также видны ядрышки и хромосомы. Мембраны можно определить как темные линии с ярким ореолом с обеих сторон, в результате чего одинарную мембрану трудно отличить от двойной. Детали маленьких объектов различить трудно; для бактерий, например, увидеть детали мешает ореол клеточной стенки. Однако если бактерию поместить в среду, показатель преломления которой такой же, как и клеточной стенки или цитоплазмы (например, концентрированные растворы альбумина бычьей сыворотки), то относительно легко увидеть такие внутренние детали, как ядерные тельца.

Интерференционная микроскопия

Как и фазово-контрастная микроскопия, интерференционная микроскопия основана на возможности преобразования различия фаз в различия интенсивностей, однако она обладает тем преимуществом, что здесь нет ореола; кроме того, метод позволяет проводить некоторые количественные измерения. Наиболее эффективная система (система Дайсона) состоит из сложного комплекса посеребренных поверхностей и рефлекторов, который делит свет, выходящий от объекта, на части, одна из которых проходит через окружающую среду и сдвигающую фазовую пластинку. При последующей рекомбинации с остальной частью света,

которая не подверглась сдвигу по фазе, происходит интерференция. При этом сдвиги по фазе, обусловленные различиями показателей преломления и(или) толщин участков объекта, преобразуются в различия интенсивностей. При использовании белого света эти участки будут иметь различную окраску, тогда как в монохроматическом свете будет наблюдаться только различие интенсивностей.

К сожалению, прибор настолько сложен, что его устройство трудно объяснить коротко. Подробное описание устройства и работы с ним можно найти в литературе, приведенной в конце главы. Главное, что должен знать каждый студент-биолог, что имеется такой необычный микроскоп, и помнить, что он позволяет следующее:

1. Получать контрастное изображение объекта без ореола в отличие от фазово-контрастной микроскопии. Кроме того, с помощью этого микроскопа можно увидеть мелкие детали, которые недоступны для фазового метода.

2. Проводить количественные измерения, недоступные с помощью фазово-контрастного микроскопа. Можно измерить разность длин оптического пути между частицей и окружающей средой. Поскольку длина пути определяется показателем преломления и толщиной, можно измерить один из этих параметров, если другой известен. Более того, можно определить концентрацию известного вещества, если известны показатель преломления и *удельный инкремент рефракции* (изменение показателя преломления на единицу количества растворенного вещества). Если $n_б$ и $n_р$ — показатели преломления белка и растворителя соответственно, то

$$n_б - n_р = \alpha c,$$

где α — удельный инкремент рефракции, а c — концентрация в граммах на 100 мл. Поскольку $n_б$ и α мало изменяются в зависимости от типа белка, пользуясь такой зависимостью, можно ориентировочно определить концентрацию белка внутри клетки.

Поляризационная микроскопия

Внимание! Прежде чем приступить к чтению этого раздела, ознакомьтесь с разделом, посвященным плоскополяризованному свету в гл. 16.

Структуры, состоящие из вытянутых молекул, расположенных параллельно, или дисков, расположенных в виде стопки, при введении в среду с показателем преломления, отличающимся от показателя преломления частиц структуры, обнаруживают способ-

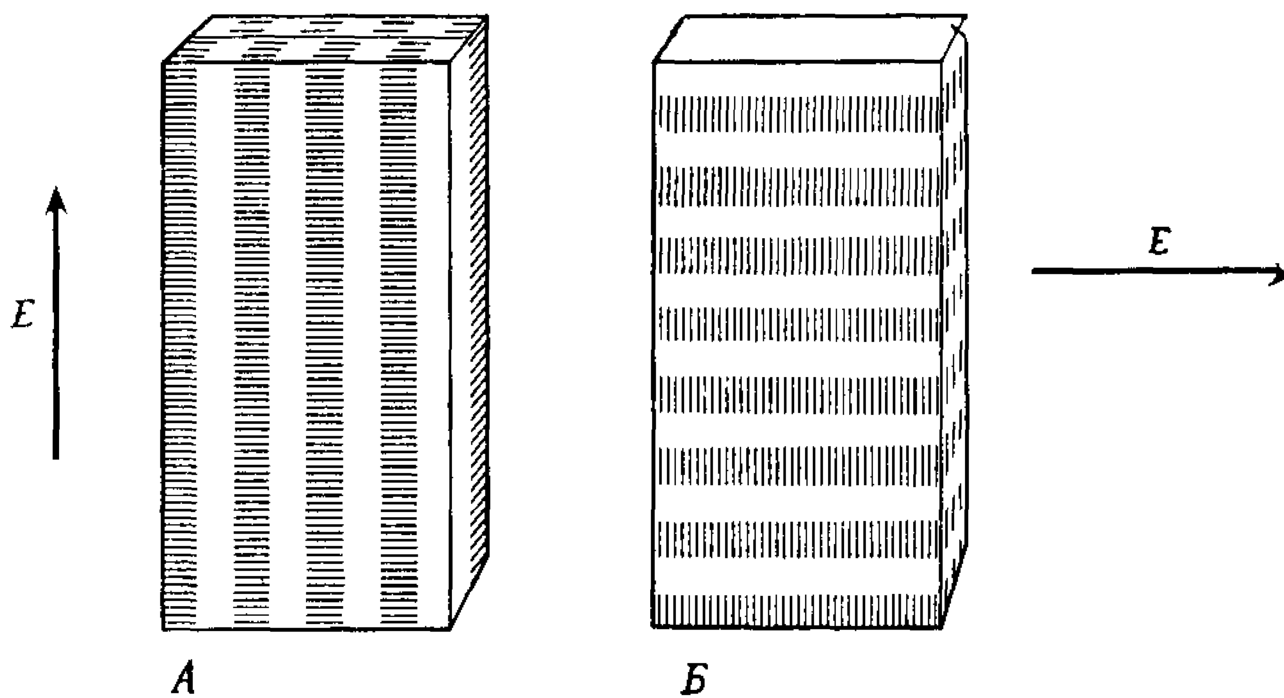


РИС. 2-14.

Структуры, дающие положительное (*А*) и отрицательное (*Б*) двулучепреломление. Плоскость вектора **E** проходит через каждую из них, как показано на рисунке.

ность к *двулучепреломлению* (рис. 2-14). Это означает, что структура будет пропускать плоскополяризованный свет только в том случае, когда плоскость поляризации параллельна длинным осям частиц. Это остается в силе даже тогда, когда частицы не обладают собственным двулучепреломлением, т. е. если частицы с равной вероятностью пропускают поляризованный свет, падающий под любым углом. [Двулучепреломление аналогично явлению, наблюдаемому при движении очень длинных молекул по трубке или при сдвиге градиента между коаксиальными цилиндрами (гл. 18).]

Появление двулучепреломления в клеточных препаратах легко наблюдать с помощью поляризационного микроскопа. Очень важно, что двулучепреломление можно использовать не только в аналитических целях для определения ориентации, но в ряде случаев оно является единственным свойством, делающим структуру видимой (например, когда частицы нельзя окрасить или когда их концентрация и удельный инкремент рефракции настолько малы, что не могут привести к достаточно большой разнице фаз, для того чтобы частицы можно было увидеть в фазово-контрастный или интерференционный микроскоп).

Важнейшим компонентом поляризационного микроскопа служит поляризатор, который располагается между источником света и конденсором. Кроме того, в микроскопе имеются вращающийся столик или держатель образца, анализатор, находящийся между объективом и окуляром, который можно установить так, чтобы его ось была перпендикулярна оси поляризатора (говорят, что в этом случае поляризатор и анализатор *скрещены*), и ком-

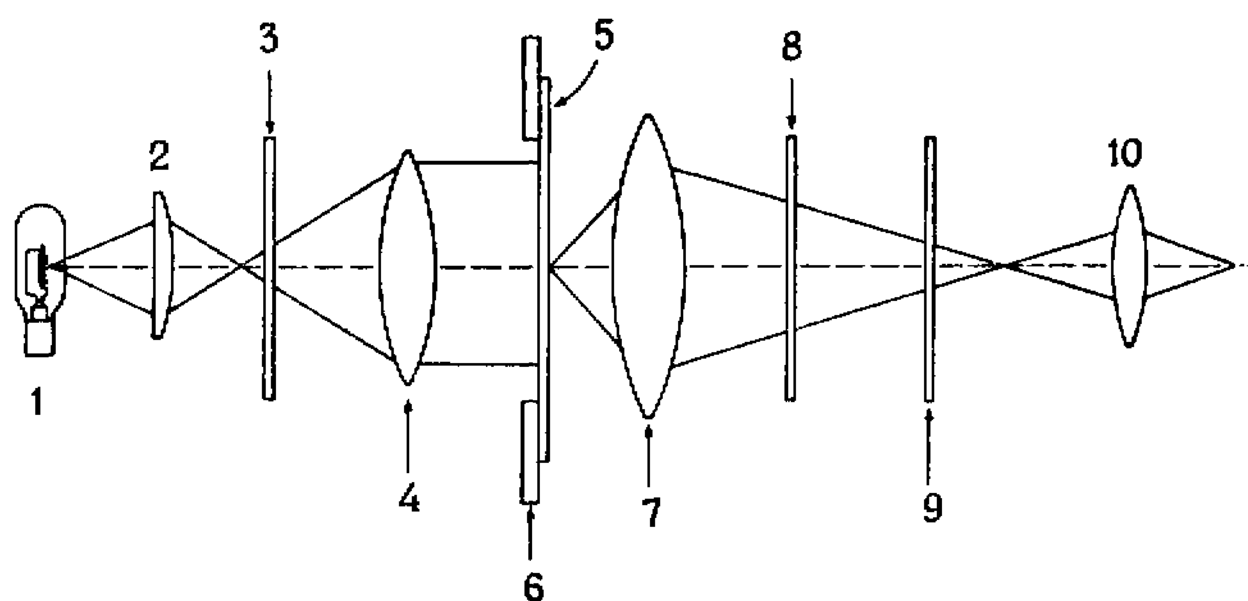


РИС. 2-15.

Оптика поляризационного микроскопа.

1 — источник света; *2* — линза поля; *3* — поляризатор; *4* — конденсор; *5* — образец; *6* — вращающийся столик; *7* — объектив; *8* — компенсатор; *9* — вращающийся анализатор; *10* — окуляр.

пенсатор (рис. 2-15). Поскольку поляризованный свет легко деполяризуется под действием отражения и преломления, конденсор регулируют таким образом, чтобы объект освещался возможно более параллельным светом.

Когда поляризатор и анализатор скрещены, а объект отсутствует или является *изотропным* (не имеет преимущественной оси преломления поляризованного света), поле выглядит равномерно темным. Если же присутствует объект, обладающий двулучепреломлением, причем он расположен так, что его ось находится под углом к плоскости поляризации, отличным от 0° или от 90°, он будет разделять поляризованный свет на два компонента — параллельный и перпендикулярный относительно плоскости анализатора (рис. 2-16). Следовательно, часть света будет проходить через анализатор, в результате чего появляется яркое изображение объекта на темном фоне. При вращении объекта яркость его изображения будет изменяться, достигая максимума при угле 45° относительно поляризатора или анализатора; если же объект находится на одной линии с любым из них, то его изображение становится невидимым (для этих целей и предусмотрен вращающийся столик).

Рассмотрим стержнеобразную структуру, проявляющую свойство двулучепреломления и ориентированную таким образом, что продольная ось находится под углом 45° к скрещенным поляризатору и анализатору. Яркость будет максимальной, если структура состоит из вытянутых параллельных молекул и уложенных стопкой дисков, поскольку в этом случае ось и плоскость дисков перпендикулярны, т. е. находятся под углом 45°. Как же можно различить параллельное («положительное») и перпендикулярное

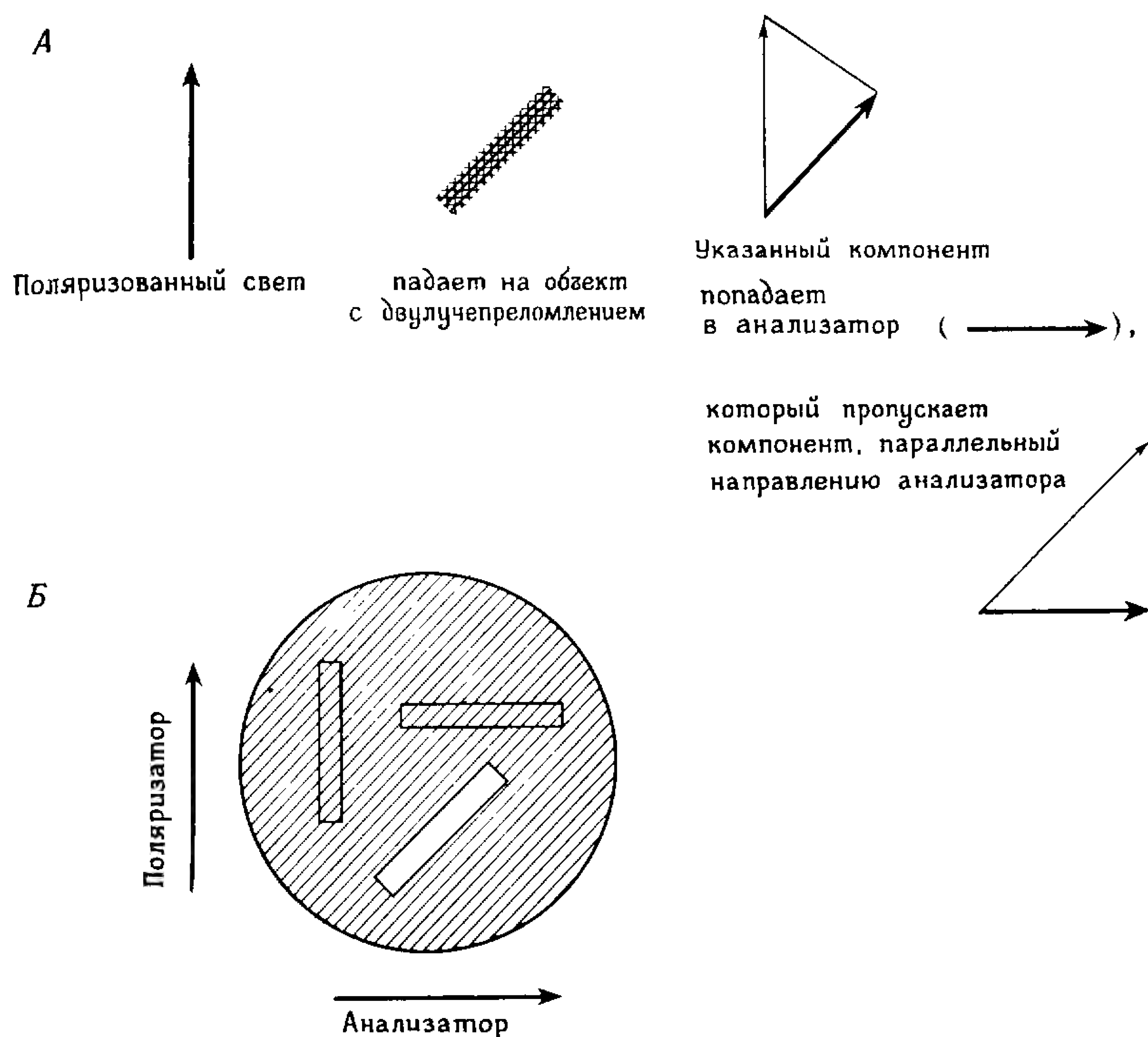


РИС. 2-16.

А — разделение поляризованного света объектом с двулучепреломлением; *Б* — вид объекта с двулучепреломлением, расположенного вдоль поляризатора, вдоль анализатора и под углом 45° к каждому из них.

(«отрицательное») двулучепреломление? Это делается с помощью *компенсатора.* Для того чтобы понять принцип действия компенсатора, следует вспомнить, что объект проявляет свойство двулучепреломления в том случае, когда показатель преломления света, поляризованного параллельно оси, отличается от показателя света, поляризованного в перпендикулярном направлении. Для положительного двулучепреломления параллельное направление имеет меньший показатель преломления, поэтому свет в этом направлении движется быстрее, чем в перпендикулярном. Если уравнять скорости параллельного и перпендикулярного компонентов, то общее значение двулучепреломления будет равно нулю, а объект станет невидимым. Рассмотрим эффект помещения между объектом и анализатором тонкого слоя кристалла, обладающего двулучепреломлением (например, слюды или гипса), для которого известно, в каком направлении

свет движется быстро и в каком — медленно. Если направление кристалла, в котором свет распространяется медленно параллельно направлению двулучепреломляющего образца, в котором свет движется быстро, скорости параллельного и перпендикулярного компонентов станут близкими и яркость объекта понизится. Поэтому вращение компенсатора позволяет идентифицировать знак двулучепреломления по положению компенсатора, в котором наблюдается максимальная и минимальная яркость. Ценность этого свойства будет понятна при рассмотрении некоторых примеров, приведенных ниже.

Применение поляризационной микроскопии в биологии и биохимии

Во многих случаях поляризационная микроскопия дает детальную информацию о молекулярной архитектуре за относительно короткое время. При изучении некоторых видов живых клеток этот метод является единственным, поскольку более точные и сложные методики, описанные в следующих главах, требуют либо высушивания образца (что неприменимо к живой клетке), либо больших объемов.

Пример 2-А. *Ориентация молекул.* Наблюдаемое в клетках двулучепреломление указывает на присутствие структур, содержащих ориентированные молекулы. Знак двулучепреломления свидетельствует о том, как эти компоненты ориентированы. Например, изучение клеток мышц и хвостовых частей сперматозоидов показало, что они содержат молекулы, расположенные параллельно направлению волокон, причем это было установлено до того, как получили данные об этих структурах с помощью электронного микроскопа.

Аналогичным образом двулучепреломление хлоропластов и палочек сетчатки показало, что они обладают ламеллярным (чешуйчатым) строением из упакованных в стопки дисков. Ориентированные волокна ДНК также имеют дисковую структуру, обусловленную пурин-пиримидиновыми парами оснований.

Измерение двулучепреломления может дать также указание на присутствие смеси двух ориентированных компонентов. В частности, миелиновая оболочка нервных клеток обладает положительным двулучепреломлением и состоит из белков и липидов. Если липиды экстрагировать подходящим растворителем, положительное двулучепреломление увеличивается; отсюда можно сделать вывод, что молекулы липидов расположены почти перпендикулярно к сильно ориентированным белкам.

Пример 2-Б. *Наблюдение структур, невидимых при применении других методов.* Существуют клеточные структуры, которые

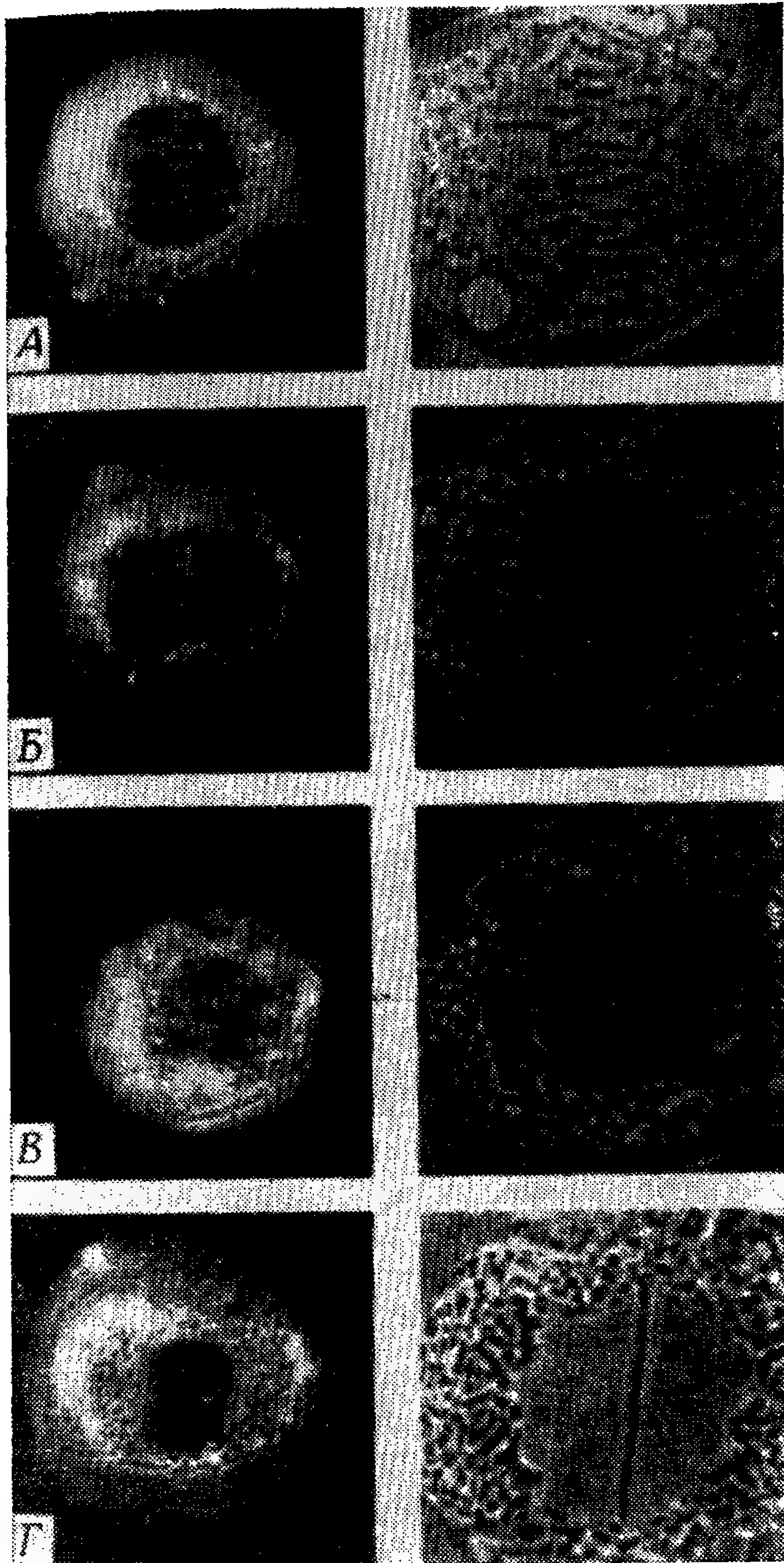


РИС. 2-17.

Деление клетки эндосперма *Haemanthus*, наблюдаемое в поляризационный (слева) и фазово-контрастный (справа) микроскопы. Одна и та же клетка проходит через различные стадии митоза.

А — метафаза, митотическое веретено видно в поляризационный микроскоп за счет его двулучепреломления, а хромосомы видны в фазово-контрастный микроскоп; *Б* — анафаза, митотическое веретено начинает распадаться; *В* — телофаза, веретено почти исчезло и образуется перегородка, разделяющая клетки; *Г* — фрагмопласт (ориентирован на поверхности клетки) виден в поляризационный микроскоп, а полностью сформировавшаяся перегородка видна в фазово-контрастный микроскоп. Увеличение на снимках справа в 1,6 раза больше, чем слева. Слева клетка не заполняет освещенный участок, который уменьшают апертурой для исключения проходящего мимо света, понижающего контраст. (Микрофотографии любезно предоставили Роберт Хайнс и Раймонд Циркле.)

нельзя увидеть при использовании любых видов микроскопии, кроме поляризационной. Примером может служить митотическое веретено (рис. 2-17) и ориентация молекул во фрагмопластах (участок границы) между растительными клетками во время деления клеток. С использованием поляризационного микроскопа и фотографирования во времени можно даже проследить развитие этих структур в живой клетке.

Пример 2-В. *Идентификация спиральной структуры.* Если волокна с положительным двулучепреломлением наблюдать, глядя вдоль оси волокон, они будут выглядеть черными при любом повороте. Однако, если волокно имеет спиральную структуру, оно будет выглядеть при поворачивании то темным, то светлым, причем темное изображение соответствует участкам, где плоскость спирали направлена в сторону наблюдателя. Таким образом, можно идентифицировать спиральные структуры. Например, включенные тела (упорядоченные агрегаты) вируса табачной мозаики в клетках листьев табака при поперечном разрезе оказываются спиральными.

Использование поляризационного микроскопа для измерения дихроизма

Все обсуждаемые выше объекты являются прозрачными. Многие объекты поглощают преимущественно в определенном направлении, что называется дихроизмом (гл. 14). Дихроизм может быть внутренним или определяться формой объекта. Внутренний дихроизм обычно присущ химическим соединениям с сопряженными циклами, для которых поглощение максимально в том случае, если плоскость поляризации совпадает с плоскостью цикла.

При обнаружении дихроизма из поляризационного микроскопа удаляют анализатор и компенсатор, так как объект сам действует как анализатор. Если обладающий дихроизмом образец осветить плоскополяризованным светом с длиной волны, при которой наблюдается поглощение, и вращать его, то таким образом можно найти угол, которому соответствует наиболее темное изображение. Если известен дихроизм молекул, находящихся в известной структуре, то можно определить и ориентацию молекул в этой структуре. Эта методика не нашла широкого распространения, однако приведенные примеры показывают, что она обладает большими возможностями.

Пример 2-Г. *Ориентация поглощающих групп в кристаллах.* Ориентация групп гема в кристаллах гемоглобина может быть определена при наблюдении кристаллов в голубом свете. Поскольку поглощение вдоль оси *b* кристалла намного большее, чем в перпендикулярном направлении, плоская поверхность групп гема должна лежать вдоль оси *b*.

Пример 2-Д. *Ориентация макромолекул в крупных структурах.* Поглощение поляризованного ультрафиолетового (УФ) света растянутыми хромосомами указывает на общую ориентацию ДНК в хромосоме, поскольку УФ-поглощение ДНК максимально в направлении, перпендикулярном оси спирали (т. е. параллельном плоскости пар оснований).

Флуоресцентная микроскопия

Флуоресценция — исключительно чувствительный метод определения минимальных количеств вещества, поскольку для любого флуоресцирующего вещества интенсивность флуоресценции пропорциональна интенсивности падающего света (гл. 15). При этом главная проблема состоит в отделении флуоресценции от падающего света. Во флуоресцентном спектрофотометре это достигается наблюдением образца под прямым углом к падающему свету. При применении флуоресцентного микроскопа задача значительно труднее и приходится использовать оптические фильтры (рис. 2-18). Фильтр, который пропускает в спектре флуоресценции только свет с длиной волны, соответствующей возбуждению, помещают между источником света и конденсором. Другой фильтр, пропускающий свет с длиной волны, соответствующей флуоресценции, но не возбуждающий свет, помещают между объективом и глазом наблюдателя. Таким образом, в отсутствие флуоресцентного объекта в глаз не будет попадать свет и поле будет черным. Если же объект флуоресцирует, то он будет контрастно выделяться на окружающем фоне. Для анализа слабой флуоресценции необходимо использовать покровные стекла, предметные стекла и линзы из нефлуоресцирующего стекла, поскольку любой из этих элементов может подсвечивать поле фона в достаточной степени. Напомним, что здесь нельзя применять апохроматические линзы, поскольку элементы, изготовленные из CaF_2, обладают сильной флуоресценцией.

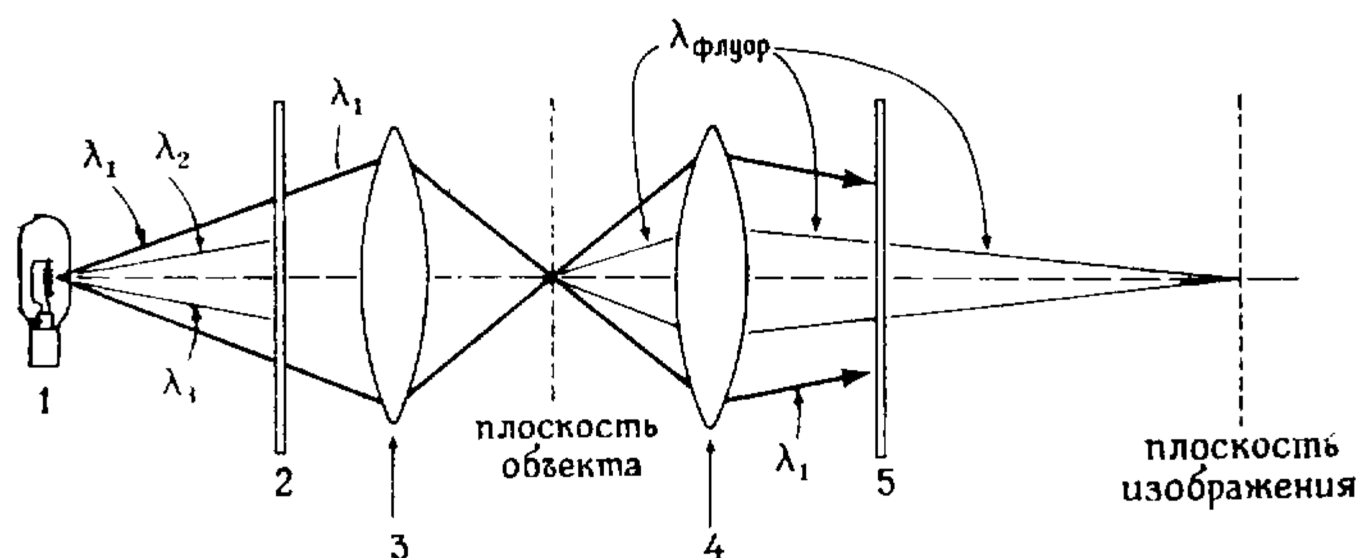


РИС. **2-18.**

Оптика флуоресцентного микроскопа.

1 — источник света; *2* — фильтр (отделяет $\lambda \neq \lambda_1$); *3* — конденсор; *4* — объектив; *5* — фильтр (отделяет λ_1).

Так как лишь немногие элементы клеток обладают выраженными флуоресцентными свойствами (исключение составляют молекулы, подобные триптофану, тирозину и рибофлавину, которые

находятся во всех частях клеток), причем лишь некоторые из них можно возбудить коротковолновым видимым или ближним УФ-светом (коротковолновый УФ-свет требует специальной оптики и системы освещения), для наблюдения обычно применяют внутренний флуорофор, т. е. такой, который при добавлении связывается с определенными компонентами клетки. Чаще всего для этой цели используют акридиновый оранжевый (для нуклеиновых кислот), флуоресцеин и хинакрин.

С помощью флуоресцентной микроскопии можно увидеть компоненты, которые трудно увидеть при применении других методов, локализовать вещество путем специфического связывания и определить ориентацию с помощью поляризационной флуоресценции. Как это делается, видно из следующих примеров.

Пример 2-Е. *Получение изображения нуклеиновых кислот в клетках животных и растений.* Акридиновый оранжевый связывается как с ДНК, так и с РНК, однако с ДНК имеет место зеленая флуоресценция, а при высокой концентрации с РНК — оранжевая флуоресценция (рис. 2-19). Таким образом, при низкой концентрации красителя в клетках эукариотов видны ярко-зеленые ядра и бледно-зеленая цитоплазма; при высоких концентрациях красителя цитоплазма становится оранжевой. При митозе хромосомы выглядят ярко-зелеными; это помогает получить их морфологические характеристики непосредственно *в живой клетке.* Если клетка инфицирована ДНК-вирусом, то можно обнаружить включения вирусов в виде ярко-зеленых пятен в цитоплазме и даже сосчитать их.

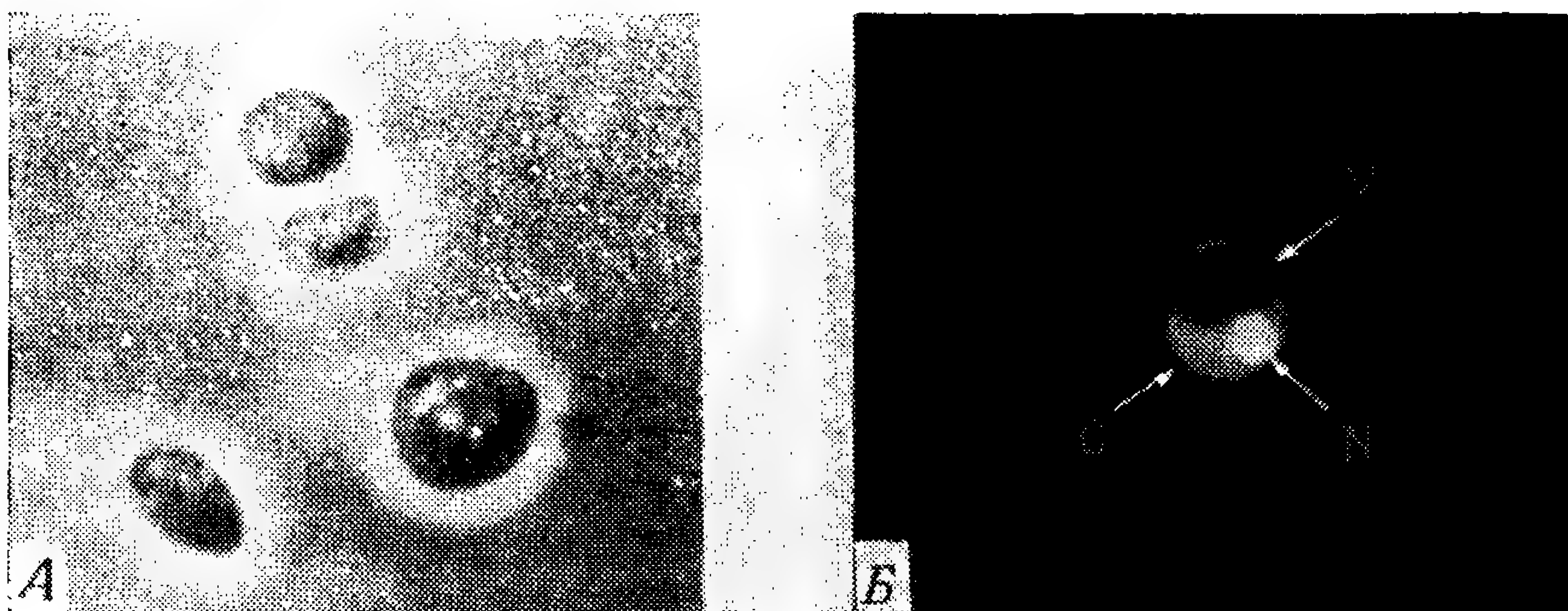


РИС. 2-19.

Микрофотографии клеток пекарских дрожжей, находящихся в периоде покоя.

А — фазово-контрастный микроскоп; *Б* — флуоресцентный микроскоп. Обратите внимание на отсутствие некоторых деталей и яркий ореол вокруг клеток на снимке *А*. На снимке *Б* к клеткам был добавлен акридиновый оранжевый, в результате чего ядра становятся ярко-зелеными (N) и их легко можно отличить от цитоплазмы (С), содержащей РНК, которая становится оранжевой, и вакуоли (V), не содержащей нуклеиновых кислот и поэтому не флуоресцирующей.

Пример 2-Ж. *Наблюдение мелких органелл.* Ядра дрожжевых клеток очень трудно увидать из-за их малого размера. Если же прибавить акридиновый оранжевый в незначительной концентрации, то на внешней стороне вакуоли будет виден ярко-зеленый полярный объект (рис. 2-19). При более высокой концентрации вакуоль останется бесцветной, ядра станут еще более яркими, а цитоплазма приобретет оранжевую окраску. Этим методом было впервые показано, что дрожжи содержат ДНК, так как для дрожжей характерно настолько большое отношение РНК/ДНК, что до начала 50-х годов химическими методами не удавалось обнаружить в них ДНК.

Пример 2-З. *Метод флуоресцентного антитела.* С антителами, полученными против частей клеток или белков, может ковалентно связываться флуоресцеин (рис. 2-20). Прибавление такого флуоресцентного антитела к тонким срезам тканей или к клеткам, которые в результате обработки кислотой или ацетоном стали проницаемыми для белка, позволяет локализовать эти вещества. Например, вирусные антигены, компоненты клеточных мембран, гистоны и многие другие вещества можно локализовать этим методом в отдельных клетках или тканях. Белки мышечных волокон, актин и миозин, можно надежно различить при использовании антиактина и антимиозина со связанным флуоресцеином.

Пример 2-И. *Поляризационно-флуоресцентная микроскопия.* Известно, что акридиновый оранжевый способен интеркалировать между парами оснований ДНК. Плоскость поляризации флуоресценции акридинового оранжевого известна, а отсюда известен и угол поляризации флуоресценции относительно оси спирали ДНК. Акридиновый оранжевый прочно связывается с хромосомами, как полагают, за счет связывания с ДНК. Поэтому поляризация флуоресценции хромосом дает возможность установить ориентацию молекулы ДНК относительно хромосомы.

Пример 2-К. *Идентификация хромосом по флуоресценции хинакрина.* Хинакрин может связываться с ДНК как в растворе, так и в хромосомах. Еще более эффективно связывается со свободными аминогруппами нуклеотидов ДНК хинакриновый иприт. При прибавлении его к клеткам хромосомы не только флуоресцируют, но также обнаруживают характерное сочетание темных и светлых зон. Причина образования таких зон не ясна; возможно, это связано с более сильным связыванием хинакрина с участками, где имеется большее содержание пар оснований аденин — тимин, и с участками, с которыми преимущественно связываются некоторые гистоны. Ценность этого метода состоит в том, что он позволяет по сочетанию зон различить хромосомы, которые морфологически различаются лишь с большим трудом. Кро-



РИС. 2-20.

Пример использования флуоресцентной микроскопии.

Изображен поперечный срез лимфатического узла кролика, клетки которого содержат антитело против альбумина бычьей сыворотки (АБС) на четвертый день после повторной иммунизации. Многие клетки дают желто-зеленую флуоресценцию флуоресцеина (на рисунке белые), тогда как фон из других клеток выглядит голубоватым (на рисунке серый). Антитело находится в цитоплазме. Ткань фиксировали 95%-ным этанолом при 4°C в течение ночи, затем обезвоживали в холодном 100%-ном этаноле, осветляли в холодном ксилоле и погружали в парафин при температуре ниже 60°C. Затем делали срез, депарафинировали его и гидратировали. Далее срез обрабатывали АБС (0,5 мг/мл в физиологическом растворе) и промывали. В результате АБС связывается только с участками, содержащими антитело, а несвязанный АБС удаляется при промывке. Анти-АБС метили флуоресцеином (две молекулы на молекулу белка) и наносили тонким слоем на срез, чтобы могла пройти реакция с любым связанным АБС. При этом обнаруживается антитело, которое находилось в клетках с самого начала. Таким способом было показано, что клетки лимфатических узлов синтезируют анти-АБС. (Любезно предоставил Альберт Коонс.)

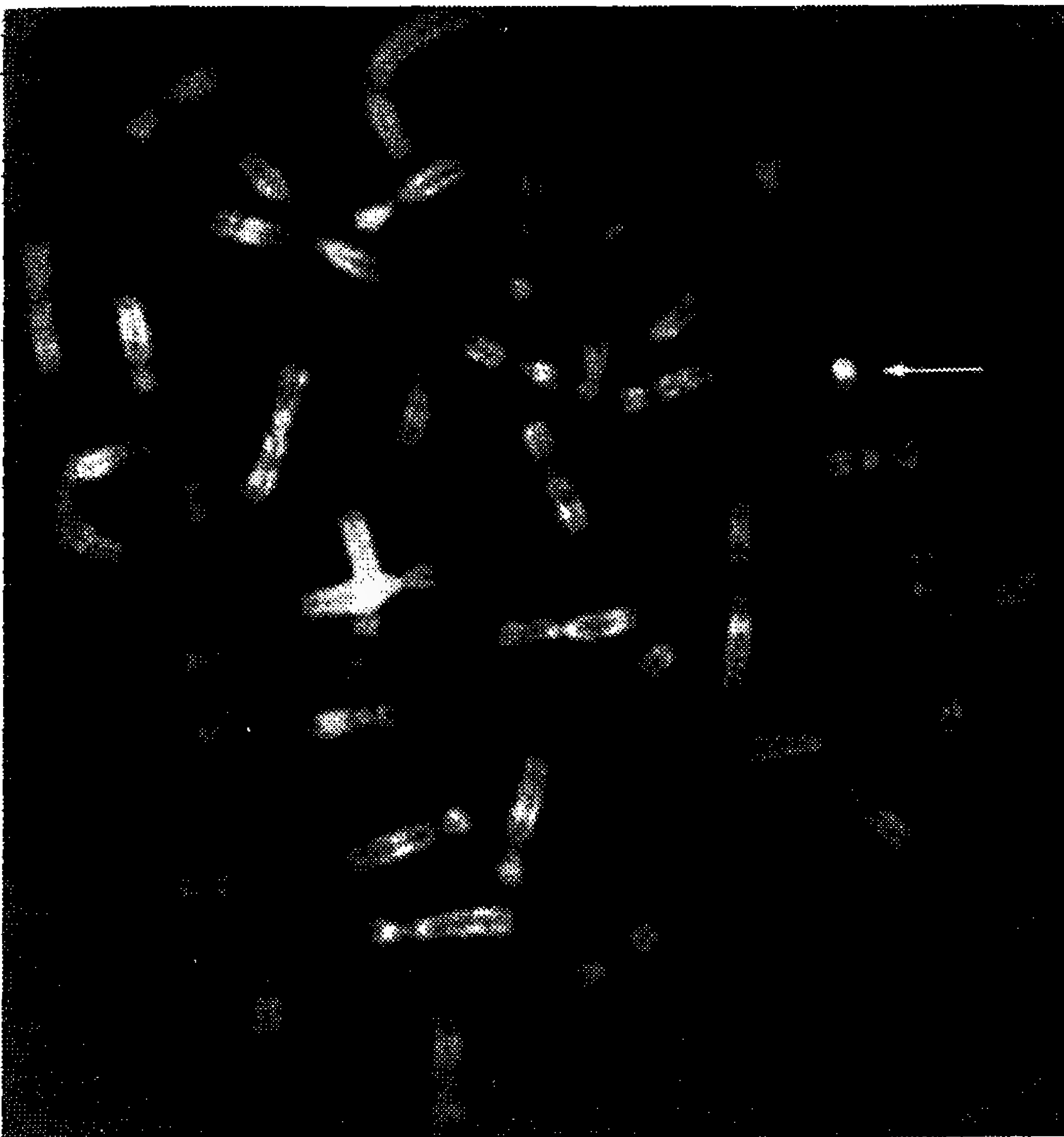


РИС. 2-21.

Вид хромосом под флуоресцентным микроскопом.

Изображены метафазные хромосомы периферических (циркуляция крови) лейкоцитов здорового мужчины, окрашенные хинакриновым ипритом. Заметим, что хромосомы флуоресцируют не одинаково, а выглядят как последовательность зон с различной яркостью. Хромосомы, морфологически не различимые при фазово-контрастной микроскопии или методом светлого поля с использованием стандартных методов окрашивания, легко отличаются по особенностям образования зон флуоресценции. Так, например, для Y-хромосомы характерна особенно яркая флуоресценция (указана стрелкой). Фон выглядит темным, так как флуоресцируют только хромосомы. Детально этот метод описан в работе: *Casperson T.*, *Lomakta G.*, *Zech L.*, Hereditas, **67**, 89 (1971). (Микрофотографию любезно предоставил Эдвард Модест.)

ме того, при этом можно наблюдать хромосомные аномалии, которые нельзя увидеть другим способом; этим объясняется большая ценность метода в клинической практике. На рис. 2-21 показаны хромосомы, окрашенные хинакриновым ипритом.

Приложение

Регулировка фазово-контрастного микроскопа

Для получения фазового контраста необходимо, чтобы изображение кольца конденсора (иногда его называют фазовым кольцом) точно фокусировалось на фазовой пластинке. Этого достигают следующим путем. Конденсор и окуляр удаляют, после чего источник света устанавливают таким образом, чтобы он находился примерно по центру объектива, если смотреть вниз через тубус. Затем на столик помещают объект, окуляр вставляют на место, выбирают объектив с желаемым увеличением, ввинчивают его в тубус и фокусируют на объекте. Затем конденсор устанавливают так, чтобы изображение диафрагмы лампы было в фокусе на плоскости объекта (условия освещения Кёлера). Под окуляром помещают специальную линзу, называемую линзой Бертрана, с помощью которой можно видеть заднюю фокусную плоскость объектива, т. е. положение фазовой пластинки. Затем навинчивают требуемое кольцо конденсора (для каждого объектива существует свое кольцо, поскольку размер кольца должен соответствовать размеру фазовой пластинки). Кольцо конденсора с помощью регулировочной ручки передвигают до тех пор, пока оно не будет концентрическим по отношению к фазовой пластинке. После этого обычно проводят окончательную фокусировку конденсора, для того чтобы изображение кольца конденсора точно совмещалось с фазовой пластинкой. Далее линзу Бертрана удаляют, после чего система готова к работе.

Список литературы

Gurr E., The Rational Use of Dyes in Biology and General Staining Methods, Williams & Wilkins, 1965.

Martin L. C., Welford W. T., The Light Microscope, in "Physical Techniques in Biological Research", vol. 1A, edited by G. Oster, Academic Press, 1971, pp. 2—70.

Oster G., Birefringence and Dichroism, in "Physical Techniques in Biological Research", vol. 1, edited by G. Oster and A. W. Pollister, Academic Press, 1955, pp. 439—459.

Osterberg H., Phase and Interference Microscopy, in "Physical Techniques in Biological Research", vol. 1, edited by G. Oster and A. W. Pollister, Academic Press, 1955, pp. 378—437.

Slayter E. H., Optical Methods in Biology, Wiley, 1970. Прекрасное исчерпывающее полное руководство.

Zernike F., Phase Contrast, a New Method for the Microscopic Observation of Transparent Objects (Parts 1 and 2), Phusica, **9**, 686—693; 974—985 (1942). В этих двух статьях разработана теория фазового контраста.

Задачи

2-1. Для подсчета числа бактерий в 1 мл бактериальной культуры удобнее всего использовать фазово-контрастный микроскоп. Однако для подсчета числа вирусов этот метод непригоден из-за слишком малого размера частиц. Объясните, как для этой цели можно использовать флуоресцентную микроскопию и акридиновый оранжевый. Какое свойство вирусов следует иметь в виду, чтобы добиться оптимальных условий подсчета? Какие вирусы легче сделать видимыми, ДНК- или РНК-вирусы?

2-2. Можно ли с помощью поляризационного микроскопа заметить какое-либо различие между структурами из стопок дисков и из стопок колец?

2-3. Объясните, почему при использовании поглощающих объектов в фазово-контрастной микроскопии качество изображения будет плохим?

2-4. Как с помощью поляризационной микроскопии можно показать дихроичные свойства объекта? Одинаковое ли действие оказывает удаление поляризатора и удаление анализатора?

2-5. Определенную клеточную структуру можно окрасить в бледно-розовый цвет. Однако она будет плохо видна в обычный микроскоп со светлым полем. Какую простую модификацию микроскопа вы можете предложить, чтобы увеличить контраст между структурой и окружающей средой?

2-6. Что можно заключить относительно молекулярной структуры объекта, если при вытягивании он приобретает способность к положительному двулучепреломлению?

2-7. Во всех микроскопах обычно предусмотрена возможность изменения интенсивности освещения; для удобства наблюдения и предохранения глаза ее обычно выбирают относительно низкой. Для какого типа микроскопов желательно получить максимально возможную интенсивность освещения?

2-8. Приведите основные соображения по поводу использования покровных стекол в микроскопии. Что произойдет с изображением, если образец находится в жидкости, а покровное стекло отсутствует?

2-9. Если клетка суспендирована в жидкости с показателем преломления таким же, как у клетки, то как будет выглядеть клетка?

2-10. Если к клеткам животных при митозе (когда хромосомы конденсируются) прибавить акридиновый оранжевый (АО), то использование для освещения света, возбуждающего АО, приведет к тому, что во флуоресцентный микроскоп хромосомы будут видны как ярко-зеленые зоны. Эту методику можно использовать для интерпретации следующего эксперимента. Существует прибор, позволяющий облучать маленькую часть клетки узким направленным пучком ультрафиолетовых лучей. Если часть хромосомы облучать таким пучком с диаметром, превышающим поперечное сечение хромосомы, то можно наблюдать одно из следующих явлений: 1) хромосома остается интактной, 2) при наблюдении в фазово-контрастный микроскоп облученная часть хромосомы выглядит бледной в сравнении с остальной частью, которая выглядит черной, 3) при наблюдении в интерференционный микроскоп с использованием белого света облученная часть отличается по цвету от остальной части, 4) при добавлении АО облученная часть не флуоресцирует и 5) при окрашивании клетки красителем, дающим красный цвет в случае присутствия дезоксирибозы, облученная часть не окрашивается, тогда как вся остальная хромосома становится красной.

Каково предположительное действие УФ-облучения? Что можно сказать о составе хромосомы? Какой вывод можно сделать о физической структуре хромосомы?

2-11. В поляризационный микроскоп с анализатором и поляризатором, перпендикулярными друг другу, наблюдали круглый плоский объект. Объект содержит яркий крест (части его пересекаются под углом 90°), который ориентирован под углом 45° относительно оси поляризатора. При вращении объекта его вид не изменяется. Какова предположительная структура объекта? Что будет наблюдаться, если из микроскопа удалить анализатор, а объект вращать?

ГЛАВА 3

Электронная микроскопия

Предел разрешения оптического микроскопа составляет приблизительно 2000 Å (гл. 2), что явно недостаточно для наблюдения клеточных органелл, вирусов и макромолекул. Однако применение электронной микроскопии предоставляет такую возможность, причем в специально подобранных условиях предельное разрешение может быть меньше диаметра атома урана, т. е. менее 5 Å.

Немного найдется устройств, которые были бы снабжены таким количеством кнопок и измерительных приборов, как электронный микроскоп. Кроме того, некоторые методики требуют от исследователя настоящего искусства и огромного внимания к мельчайшим деталям. Тем не менее в большинстве случаев использование прибора не связано с серьезными затруднениями, а приготовление образцов довольно простое. Не может быть сомнений в том, что каждая лаборатория должна иметь доступ к электронному микроскопу, а каждый биохимик должен быть достаточно осведомлен о возможностях его использования. В данной главе мы не будем касаться специфических методик или технических подробностей, а покажем возможности метода и опишем его принцип действия.

Принцип действия электронного микроскопа

Обычный оптический микроскоп состоит из источника света, конденсора, фокусирующего свет на объекте, держателя (т. е. предметного стекла и столика), объектива для фокусирования изображения и окуляра для проекции изображения, которое дает объектив, на фотопленку или в глаз наблюдателя (гл. 2). Эта же схема действует и в электронном микроскопе, за исключением того, что свет заменен пучком электронов, вместо держателя образца имеется проволочная *сетка* и вместо стеклянных линз используются электромагнитные.

Электронная линза, в основе которой лежит электромагнит с осевой * симметрией, через который проходит электронный пучок, схематически изображена на рис. 3-1, *А*. (Фокусирующее действие магнитного поля очень сложно и здесь рассматриваться не

* Часто говорят, что электромагнитные линзы обладают цилиндрической симметрией, подразумевая при этом их цилиндрическую форму. Более точным термином здесь будет «осевая симметрия», поскольку в данном случае имеет место симметрия относительно оси.

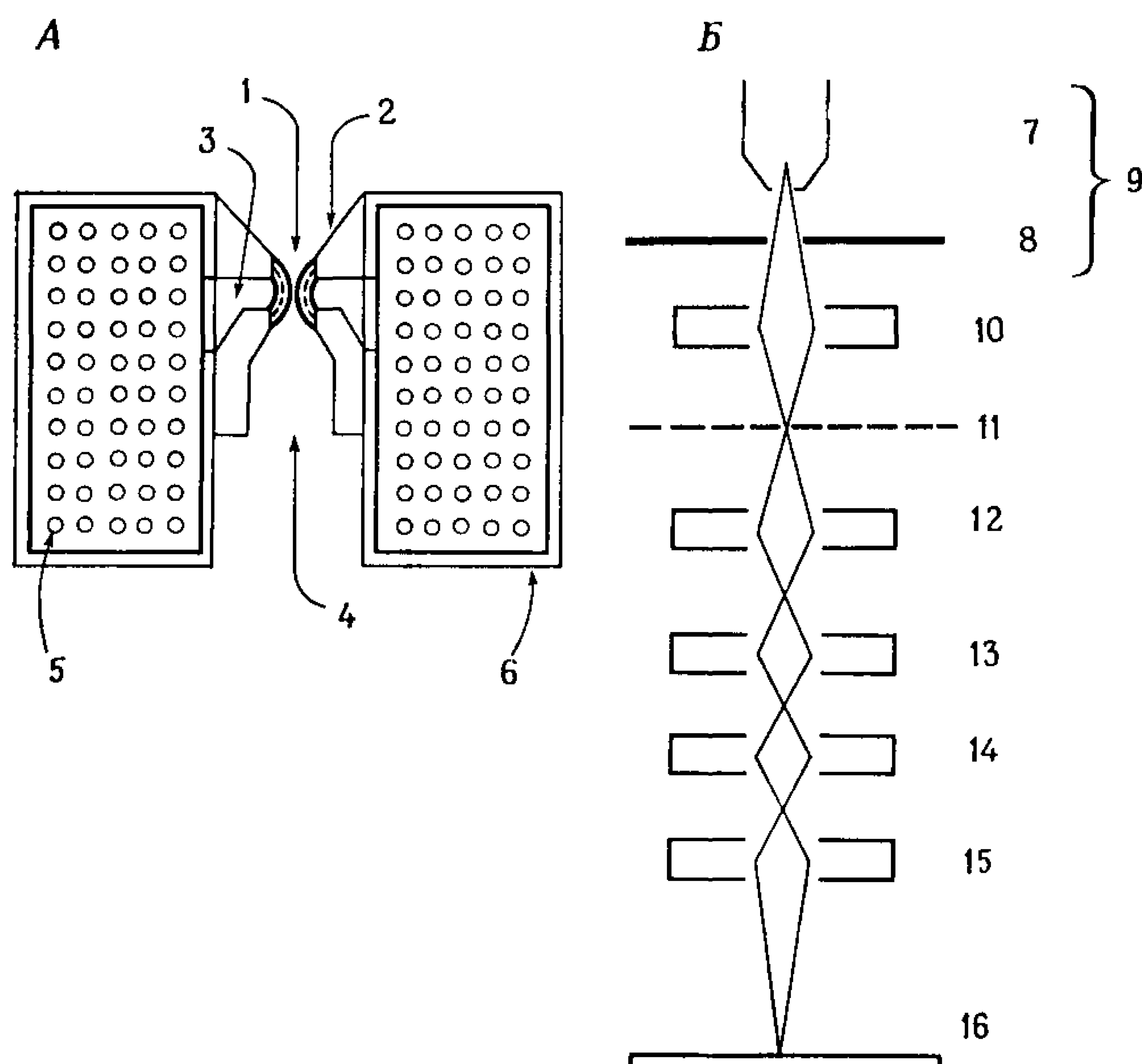


РИС. 3-1.

А — электромагнитная линза. Хотя в деталях могут быть отличия, каждая линза имеет железный кожух, заключающий обмотку из медной проволоки, по которой проходит электрический ток, и полюсные наконечники, концентрирующие силовые линии магнитного поля. В действительности магнитная линза имеет диаметр 120 мм и более, а диаметр канала измеряется микрометрами. *Б* — прохождение электронов через систему линз электронного микроскопа. Электроны движутся от спирали накаливания вниз. Компоненты микроскопа и луч изображены без соблюдения масштаба. В некоторых микроскопах имеется два конденсора; иногда отсутствует дифракционная линза.

1 — силовые линии; *2* — полюса; *3* — зазор; *4* — канал; *5* — обмотка; *6* — железный кожух; *7* — спираль накаливания; *8* — анод; *9* — электронная пушка; *10* — конденсорная линза; *11* — образец; *12* — линза объектива; *13* — промежуточная линза; *14* — дифракционная линза; *15* — проекционная линза; *16* — флуоресцентный экран или фотопластинка.

будет. Более подробную информацию можно найти в работах, приведенных в списке литературы в конце главы.) Магнитное поле генерируется обмоткой из медной проволоки. Для получения большого увеличения линзы имеют короткое фокусное расстояние, причем показано, что фокусное расстояние уменьшается с увеличением напряженности магнитного поля. Напряженность магнитного поля можно увеличить, усиливая ток в обмотке, однако это сопровождается выделением большого количества тепла. Поэтому прибегают к концентрированию поля путем помещения обмотки в кожух из мягкого железа и введения двух конических элементов из мягкого железа, которые называются *полюсными*

наконечниками, причем каждый из них имеет небольшой канал, через который проходит пучок. Получающееся расположение магнитных силовых линий показано на рис. 3-1, *Б*.

Как отмечалось ранее, приводимое короткое описание не претендует на объяснение действия электромагнитной линзы, а служит для рассмотрения ее основных частей и ознакомления с терминологией, применяемой в электронной микроскопии. Важно отметить, что расходящийся пучок электронов можно сфокусировать в определенных пределах (поскольку существует значительная сферическая аберрация) в точку на оси линзы.

Оптическая система электронного микроскопа изображена на рис. 3-1, *Б*. Источником излучения служит раскаленная добела вольфрамовая спираль, которая испускает электроны. Потенциал анода, к которому движутся электроны, обычно на 40—100 кВ больше потенциала спирали. Спираль и анод вместе составляют *электронную пушку*. Анод имеет небольшой канал, через который проходят наиболее быстрые электроны. Этот канал вместе с маленькой апертурой сжимает поток электронов, давая на выходе узкий электронный пучок. Этот пучок несколько расходится, поскольку электроны на выходе из канала отклоняются за счет положительного потенциала анода. Расходящийся пучок фокусируется на образце с помощью электромагнитной линзы — конденсора. Как правило, не следует слишком резко фокусировать пучок на образце, так как мощный поток электронов приведет к разрушению образца.

Изображение образуется за счет так называемого вычитающего действия образца. Оно заключается в рассеянии некоторых электронов атомами объекта. Распределение этой потери электронов приводит к получению изображения (таким же образом понижается поглощающим образцом интенсивность светового потока в оптическом микроскопе). Линза *объектива,* отрегулированная так, чтобы образец находился точно в фокусной точке, вновь фокусирует пучок с образованием изображения. Это изображение затем увеличивается в несколько стадий тремя электромагнитными линзами, которые называются *дифракционная, промежуточная* и *проекционная.* Третья, проекционная линза и дает изображение либо на флуоресцентном экране, либо на фотопластинке.

Три особенности отличают электронный микроскоп от оптического. Во-первых, электроны в воздухе не могут проходить больших расстояний, поэтому колонна микроскопа должна находиться в высоком вакууме; это означает, что объект должен быть всегда сухим, т. е. наблюдение живых объектов невозможно. Во-вторых, поскольку увеличение электромагнитной линзы пропорционально напряженности магнитного поля, которая в свою очередь пропорциональна силе тока в обмотке, увеличение можно

изменять, варьируя силу тока в катушке линзы. В оптической микроскопии это сделать невозможно по причине фиксированных размеров имеющихся линз, т. е. для достижения значительной степени увеличения необходимо иметь большой набор объективов. В-третьих, ни один из видов первичной аберрации (т. е. сферической и хроматической аберраций, гл. 2) не может быть скорректирован, так как электромагнитные линзы всегда являются собирающими. (В микроскопе Крева, который будет описан ниже, существует возможность частичной коррекции сферической аберрации.) Для уменьшения сферической аберрации, а следовательно, улучшения качества изображения, линзы должны работать при очень малых числовых апертурах. [Числовая апертура (NA) обсуждается в гл. 2.] Здесь имеет место некоторое ограничение разрешения за счет длины волны Комптона электрона, так как предел разрешения составляет 0,61 λ/NA. Для электрона длина волны Комптона $\lambda = hc/E$, где h — постоянная Планка, c — скорость света, E — энергия электрона. Для электрона с энергией 60 кВ длина волны составляет 0,03 Å. Однако в связи с тем, что числовая апертура магнитной линзы обычно составляет около 0,0005, практический предел приближается к 4 Å. (Как будет показано ниже, природа объекта позволяет лишь в редких случаях достичь этого предела разрешения.) Таким образом, электронный микроскоп позволяет реально получить приблизительно в 500 раз более высокое разрешение, чем оптический микроскоп.

Методы приготовления образцов и получения контрастного изображения

Получение образцов на подложке

Поскольку все вещества обладают высокой способностью рассеивать электроны, необходимо, чтобы образец был очень тонким, иначе пучок не будет проходить через него. На практике максимально допустимая толщина составляет около 0,1 мкм (1000 Å) для получения разрешения порядка 100 Å и от 50 до 100 Å для разрешения в 10 Å. Это требование не вызывает трудностей при наблюдении вирусов, фибрилл и макромолекул, однако для большинства клеток, размеры которых составляют от 1 до 50 мкм в толщину, возникает необходимость получения тонких срезов (см. разд. «Заливка, получение срезов и окрашивание»). Это требование означает, что подложка образца (эквивалент предметного стекла в обычном микроскопе) также должна быть очень тонкой,

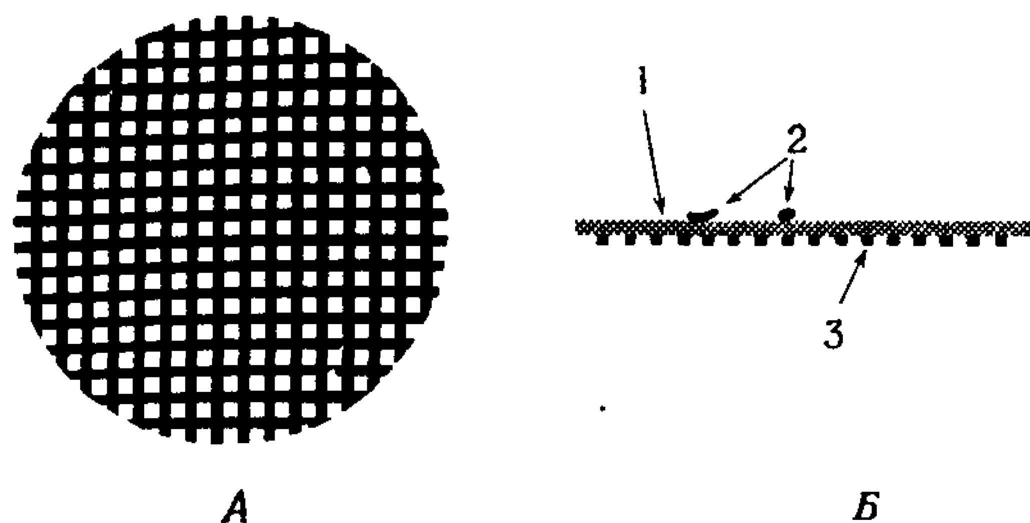


РИС. 3-2.

Держатель образца или сетка, которая состоит обычно из тонкой медной сетки, покрытой тонкой пленкой пластика или углерода (пленка-подложка). Образец удерживается пленкой-подложкой.

А — вид сверху; *Б* — вид сбоку. *1* — пленка-подложка; *2* — образец; *3* — металлическая сетка.

толщина ее должна быть равномерной и не иметь явной структуры при большом увеличении.

Подложка образца, или *сетка* (рис. 3-2), для всех образцов представляет собой медный диск (в некоторых случаях платиновый) с отверстиями размером приблизительно 75 мкм, покрытый тонкой «прозрачной для электронов» пленкой, называемой пленкой-подложкой *. Прозрачность для электронов означает низкую и одновременно равномерную способность к рассеянию электронов. Наиболее часто применяемые пленки представляют собой слои толщиной от 100 до 200 Å либо углерода, либо различных пластиков (парлодион, формвар). К сожалению, любая пленка-подложка обладает собственной структурой, поэтому при исследовании структур макромолекул, размеры которых сравнимы с толщиной пленки, вариации интенсивности фона приводят к образованию «зерна», причем размеры зерен составляют от 5 до 10 Å. Это серьезно ограничивает разрешение. Пленки получают одним из следующих трех способов (рис. 3-3). Для получения пленки из парлодиона каплю раствора парлодиона в амилацетате помещают на поверхность воды. (Поверхность жидкости используется для получения очень ровной пленки.) Капля растекается по поверхности, растворитель испаряется, после чего получается тонкая пленка пластика. Пленки из формвара получают путем погружения ровного предметного стекла в раствор пластика, после чего стекло извлекают, высушивают и медленно опускают в воду. В результате на поверхности воды остается тонкая формварная пленка. (Такой метод погружения некоторые специалисты предпочитают и для парлодиона.) Углеродные пленки получают напылением на свежерасщепленные пластинки слюды, которые имеют ровную на молекулярном уровне поверхность, так как являются одной плоскостью кристалла, с последующим перенесени-

* Термин «сетка» используется специалистами для обозначения как диска с отверстиями как такового, так и диска, покрытого пленкой-подложкой.

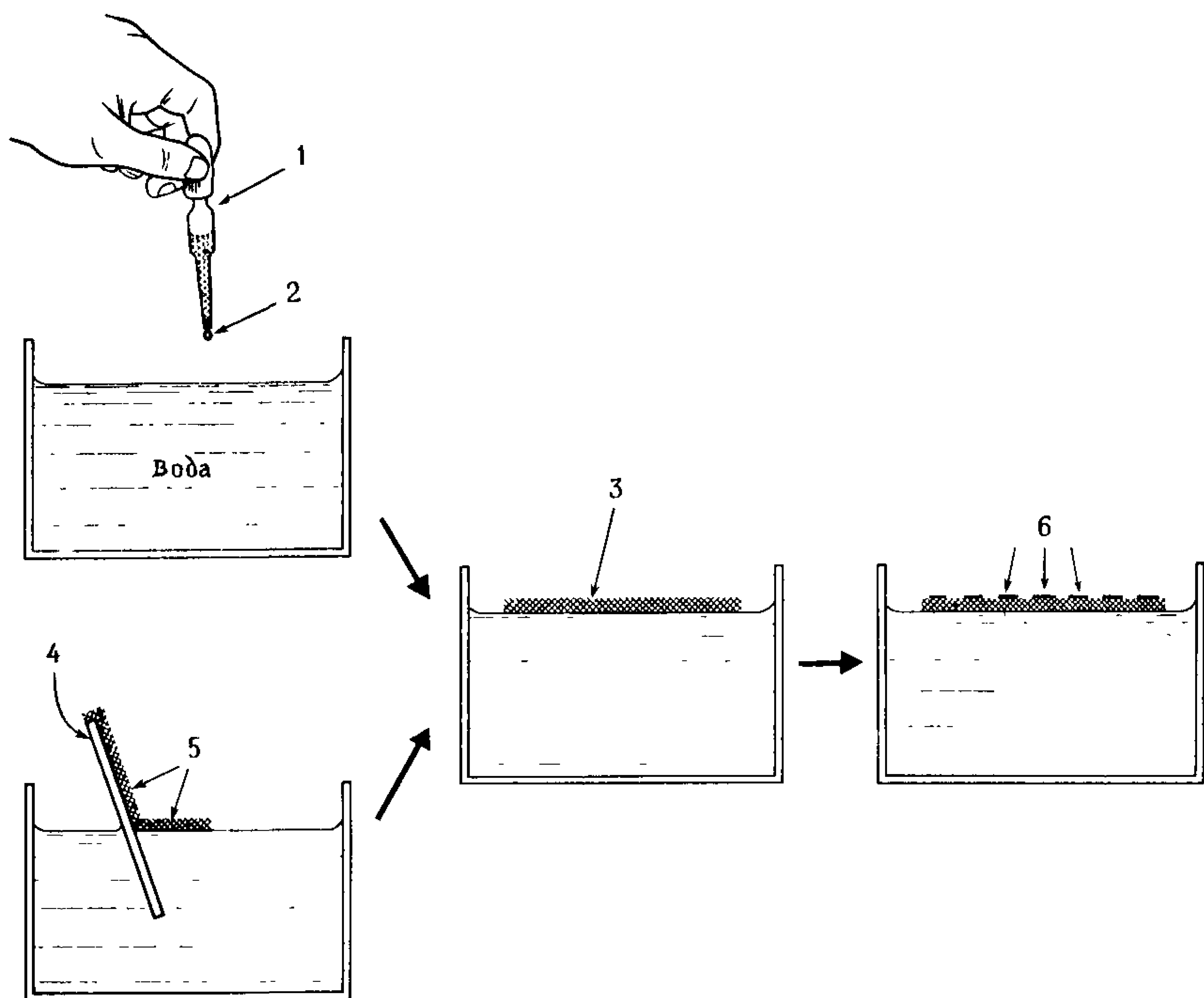


РИС. 3-3.

Получение пластиковой пленки-подложки.

В одном варианте на чистую поверхность воды наносят каплю раствора парлодиона в амилацетате. Капля расплывается, растворитель испаряется, после чего остается тонкая пленка пластика. В другом варианте предметное стекло микроскопа покрывают тонкой пленкой из парлодиона или формвара путем погружения стекла в раствор пластика с концентрацией значительно меньшей, чем используется в капельном методе. В некоторых случаях пленка представляет собой тонкий слой углерода, напыляемого в вакууме на поверхность стекла или листка слюды. При опускании стекла в воду пленка сходит со стекла и плавает на поверхности воды. Затем на поверхность пленки помещают сетку, а сверху прикладывают кусок фильтровальной бумаги. Если после этого поднять бумагу, то сетка прилипнет к бумаге. В другом способе применяется сосуд с краном в дне. Сетку помещают на подставку, которая сверху покрывается водой. Затем на поверхности воды получают пленку, открывают кран на дне сосуда и, после того как уровень воды станет ниже сетки, пленка полностью ляжет на сетку. *1* — медицинская пипетка; *2* — раствор парлодиона в амилацетате; *3* — пленка, полученная при расплывании капли; *4* — стеклянная пластинка; *5* — пленка; *6* — сетки.

ем пленки на поверхность воды, как в случае получения пленок из формвара. Затем пленки наносятся на сетку одним из двух способов. Первый состоит в том, что сетку помещают на дно сосуда, заливают водой, на поверхность которой помещают пленку, после чего воду спускают. В другом варианте сетку помещают на пленку сверху (рис. 3-3) и подложку извлекают, прикасаясь к ней листком пластика или фильтровальной бумаги.

Подготовка образцов и увеличение контраста

Собственный контраст биологических материалов невелик из-за того, что рассеяние электронов луча атомами углерода пленки-подложки имеет тот же порядок, что и рассеяние всех основных атомов образцов (C, N, O, P, S). Обычно для усиления контраста в структуру вводят атомы тяжелых металлов с высокой рассеивающей способностью, причем таким образом, чтобы получаемая картина каким-либо образом отражала особенности структуры образца. Чаще всего используют осмий, платину, свинец и уран, хотя иногда применяют хром, палладий, вольфрам и золото. Некоторые стандартные методы получения образцов и увеличения контраста будут приведены далее.

Заливка, получение срезов и окрашивание

Если наблюдаемый материал слишком толст для того, чтобы через него могли проходить электроны, необходимо получить из него тонкий срез. Для этого материал должен быть достаточно жестким. Жесткость достигается с помощью процесса, называемого *заливкой,* который заключается в постепенном замещении воды в образце органическим мономером (например, метилметакрилатом), который при полимеризации дает твердый материал. После затвердевания считается, что полимерный блок содержит неразрушенный образец, который затем разрезают с помощью ультрамикротома на слои толщиной от 500 до 1000 Å. Эти срезы затем окрашивают (иногда окрашивание проводят перед заливкой), выдерживая их в растворах солей молибдена, вольфрама, свинца или урана, либо в парах тетраокиси осмия. (Термином *окрашивание* обозначается процесс введения атомов тяжелого металла с помощью химической реакции или в результате образования комплексов с некоторыми компонентами образца для увеличения электронной плотности.) Таким способом атомы тяжелых металлов вводятся в белки, а также в другие макромолекулы и агрегаты, создавая тем самым в образце участки с высокой электронной плотностью. Окрашенные препараты дают прекрасные картины (рис. 3-4) со множеством важных деталей, которые интерпретируются по распределению атомов металлов, т. е. по функциональным группам, с которыми способен реагировать конкретный окрашивающий агент. Следует иметь в виду, что при этом могут возникнуть артефакты. Например, при включении осмия с обратной стороны толстой мембраны на изображении получаются две черные линии, разделенные неокрашенным пространством, что может привести к ошибочному заключению о наличии двухслойной мембраны. Процедуры заливки и получения среза сами по себе могут вносить искажения за счет смеши-



РИС. 3-4.

Электронная микрофотография ультратонкого среза *Euglena gracilis*, окрашенного тетраокисью осмия (любезно предоставили Джером Шифф и Ненси О'Донохью).

1 — митохондрия; *2* — ядрышко; *3* — ядро; *4* — хлоропласт; *5* — гранула крахмала.

вания образца с органическим мономером и собственно разрезания.

При наблюдении тонкого среза получается картина, отвечающая монослою, что не всегда соответствует истинной структуре. Для получения представления об образце в целом необходимо исследовать большое число срезов. Элегантный, хотя и очень трудоемкий метод получения *серийных срезов* заключается в получении последовательных срезов образца с их исследованием в порядке получения.

Получение реплик

Метод, используемый для наблюдения поверхности образцов, непрозрачных для электронов или легко разрушающихся, называется получением реплик. Для этого образец покрывают тонким

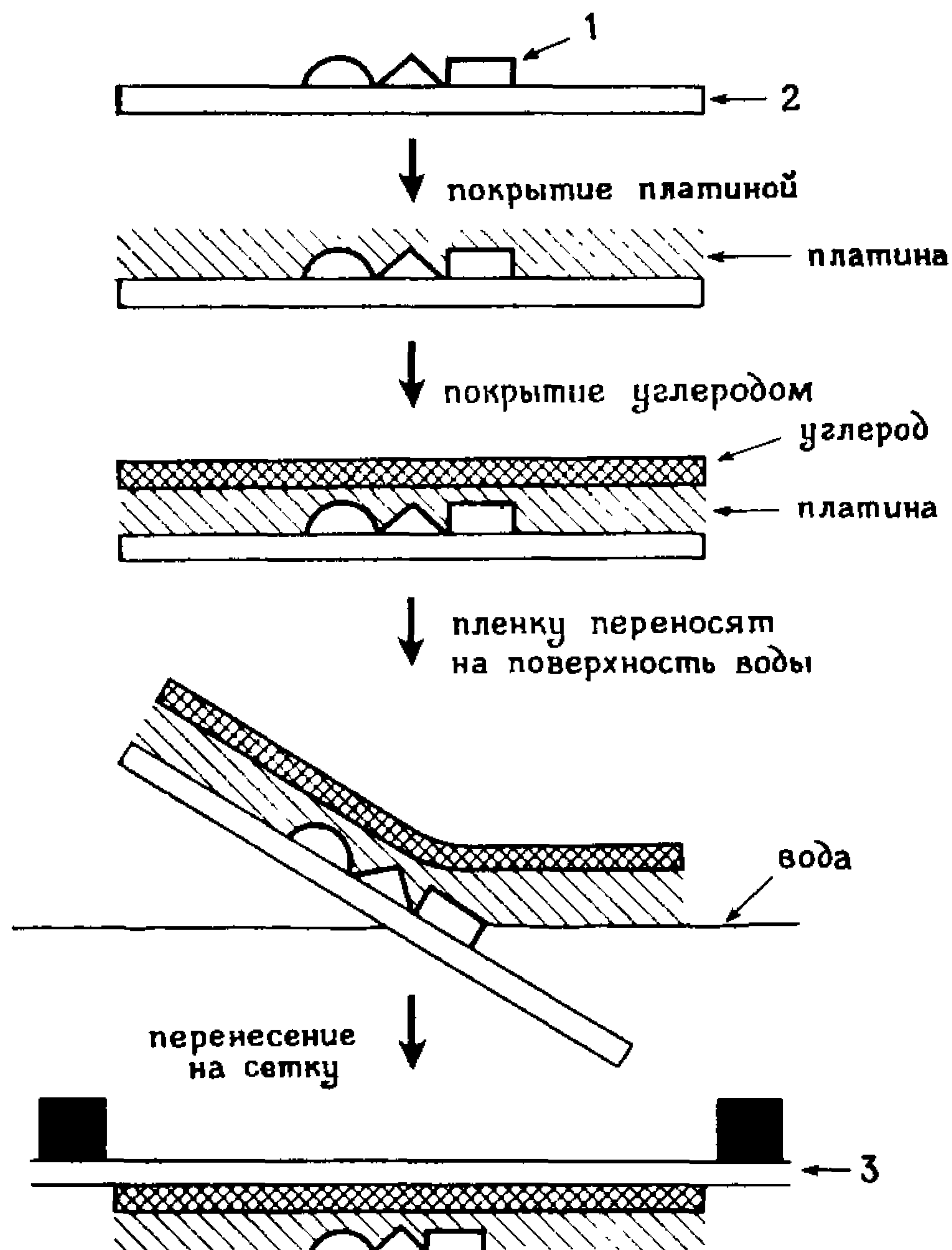


РИС. 3-5.

Получение углерод-платиновой реплики. В некоторых случаях пленку-подложку соединяют со слоем углерода до нанесения на поверхность воды. Для извлечения пленки затем используют чистую сетку (см. подпись к рис. 3-6).

1 — образец; *2* — держатель; *3* — пленка-подложка на сетке.

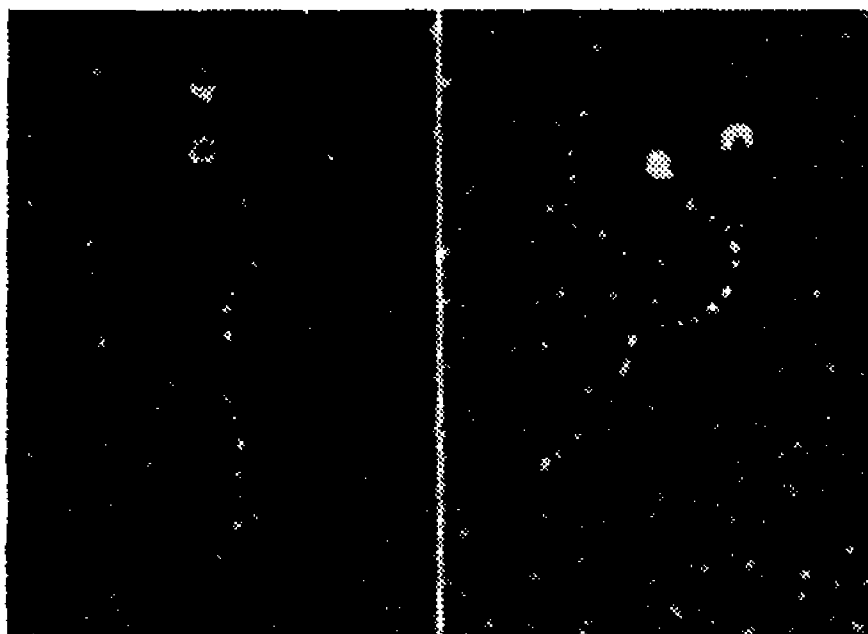


РИС. 3-6.

Реплики молекул миозина (ширина каждого снимка около 1200 Å).

Раствором миозина из мышцы кролика опрыскивали поверхность свежерасщепленной слюды. После высыхания раствора сверху напыляли тонкий слой платины методом оттенения под малым углом. На слой платины наносили слой углерода и, наконец, сверху покрывали пленкой из парлодиона. Затем слюду медленно погружали под малым углом в воду. Пленка отрывалась от слюды и плавала на поверхности. Далее пленку переносили на сетку. [*Lowey S.*, *Slayter H. S.*, *Weeds A. G.*, *Baker H.*, J. Mol. Biol., **42**, 1 (1969)]

слоем платины, а затем для придания жесткости — поддерживающим слоем углерода, причем слои наносят напылением в вакууме или методом оттенения (shadow-casting) (см. рис. 3-8 и примечание к нему). Полученный двойной слой затем помещают на поверхность воды и переносят на сетку (рис. 3-5). Полученная реплика представляет собой оттиск поверхности объекта, т. е. ее контур совпадает с контуром объекта. Этот метод находит применение для изучения поверхностей вирусов, мембран и некоторых кристаллов белков, которые сразу же разрушаются под действием пучка электронов. Пример реплики показан на рис. 3-6.

Методы замораживания — травления (лиофилизация) и критической точки

Перед получением реплик вода должна быть удалена из образца, так как получение пленки методом оттенения необходимо проводить в вакууме. При этом возникает ряд проблем, связанных с тем, что при сушке на воздухе структуры обычно испытывают сжатие в результате эффектов поверхностного натяжения при фазовых изменениях во время испарения растворителя. Методы замораживания — травления и критической точки позволяют избежать артефактов, связанных с высушиванием. В методе замораживания — травления образец быстро замораживают, делают срез или ломают, после чего помещают в вакуум при таких давлении и температуре, когда вода возгоняется с поверхности образца (травление). Затем получают реплику этой поверх-



РИС. 3-7.

Фаг Т2 *E. coli* был обработан методом замораживания — травления. Для получения реплики использовали слегка измененный метод критической точки. Хорошо видны детали поверхности хвоста фага. Сравните это изображение с изображениями, полученными другими методами (рис. 3-10 и 3-12). (Любезно предоставил Манфред Байер.)

ности путем напыления платины или углерода в вакууме. Пример реплики, полученной таким методом, приведен на рис. 3-7.

Метод критической точки основан на том, что для каждого вещества существует характеристическая «критическая температура», выше которой не может существовать жидкая фаза. Процедура заключается в следующем. Влажный образец вымачивают в этаноле, а затем этанол обменивают на жидкий CO_2 под давлением при 15°C. Далее температуру образца повышают до 31°C (критическая температура), при которой CO_2 превращается в газ. При этом предполагается, что все трехмерные параметры сохраняются. После этого можно получить реплику или же образец непосредственно можно наблюдать в микроскоп, если он был предварительно окрашен. Этот метод особенно полезен, когда необходимо предохранить макромолекулярные структуры при нанесении молекул на пленку из раствора.

Метод оттенения

Электронная микроскопия изучает в основном структуры частиц, таких, как вирусы, фаги и рибосомы, и макромолекул. Данные о размерах таких объектов и некоторая информация о их структуре могут быть получены методом оттенения. Частицы (в растворе или суспензии) наносят на сетку, покрытую пленкой-подложкой методом опрыскивания. Жидкость быстро испаряется, образец помещают в вакуум, после чего напыляют тяжелый металл. Для этого требуется кипящий металл при температуре раскаленного добела вольфрама, чего можно достигнуть либо обматывая металлическую проволоку вокруг вольфрамовой спирали (рис. 3-8), либо помещая небольшие кусочки напыляемого металла в вольфрамовый контейнер. Атомы металла движутся по прямой во всех направлениях в том случае, когда вакуум достаточно высок. Если испарение проводят под острым углом (рис. 3-9), металл будет покрывать только одну сторону образца, а сетка будет покрыта полностью, за исключением участка в тени образца. Если известны вертикальное (H) и горизонтальное (L) расстояния от источника испаряемого металла до образца, то высоту частицы над поверхностью решетки (h) можно рассчитать по длине тени, отбрасываемой образцом (d), так как $h/d = H/L$. Таким образом можно определить размеры частицы. На рис. 3-10 показано исследование фагов этим методом.

Метод оттенения обычно менее эффективен в случае меньших макромолекул, поскольку сами тени имеют меньший размер, а влияние зернистости подложки становится значительным. Многие из этих трудностей можно обойти при использовании *метода негативного контрастирования,* описанного в следующем разделе.

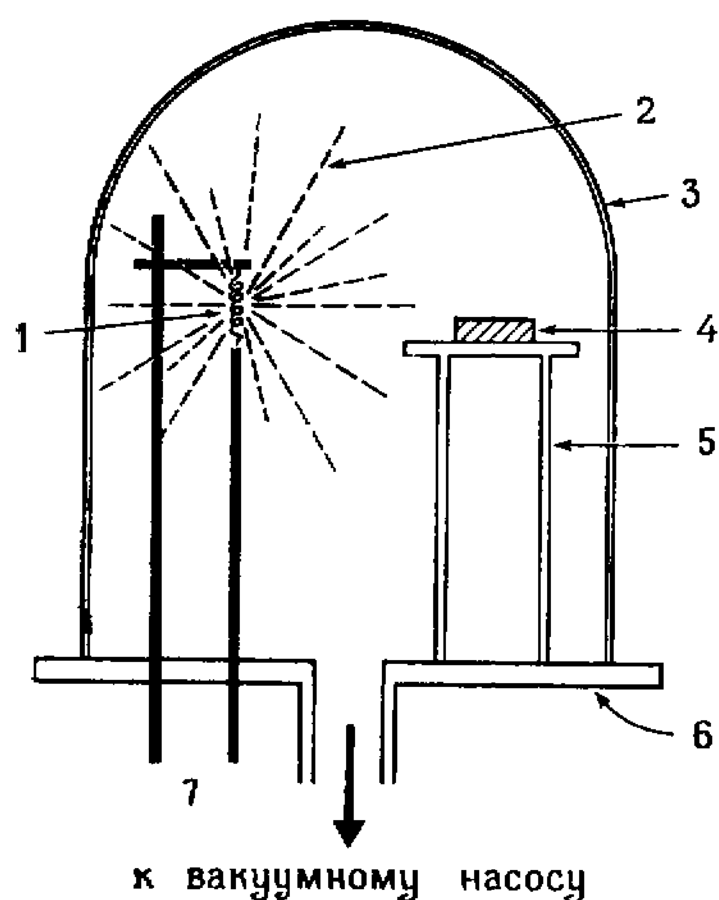


РИС. 3-8.

Аппарат для испарения в вакууме или для нанесения пленки методом оттенения.

Вакуум под колоколом создается с помощью вакуумного и диффузионного насосов. Вольфрамовая спираль, вокруг которой обматывается проволочка из испаряемого металла, нагревает металл до кипения. В течение 10—15 с металл испаряется, образуя на образце пленку. Толщина пленки пропорциональна количеству взятого металла и обратно пропорциональна квадрату расстояния от спирали до образца. *1* — спираль; *2* — испаряющийся металл; *3* — колокол; *4* — образец; *5* — платформа; *6* — основание; *7* — электроды.

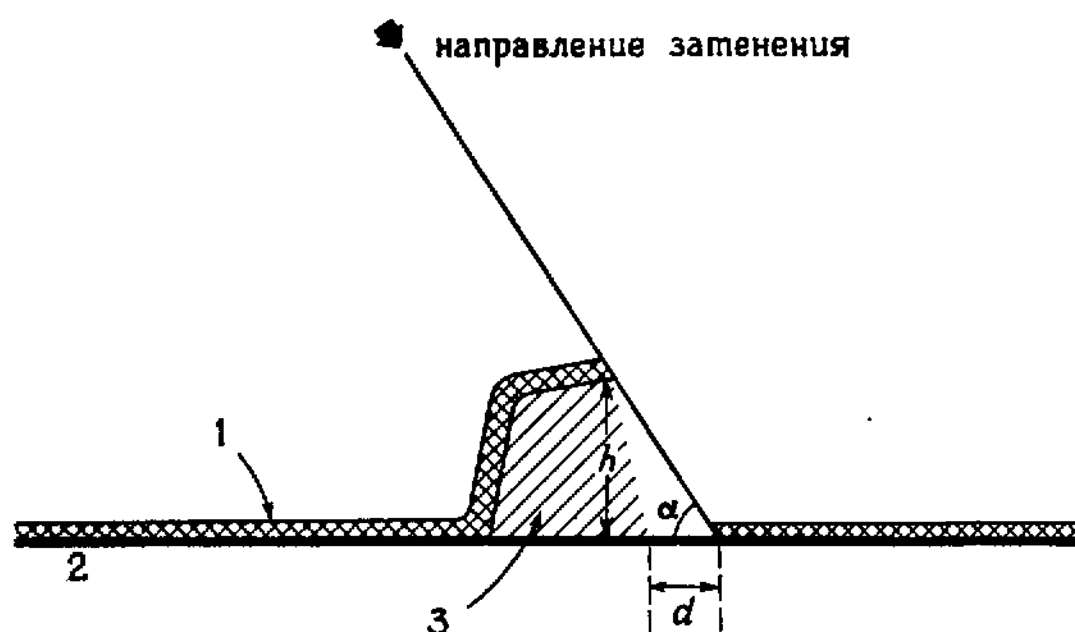


РИС. 3-9.

Определение высоты объекта по длине его тени. Поскольку испарение происходит не прямо над образцом, существует участок на пленке-подложке, куда металл не попадает.

1 — напыленный материал; *2* — сетка; *3* — образец.

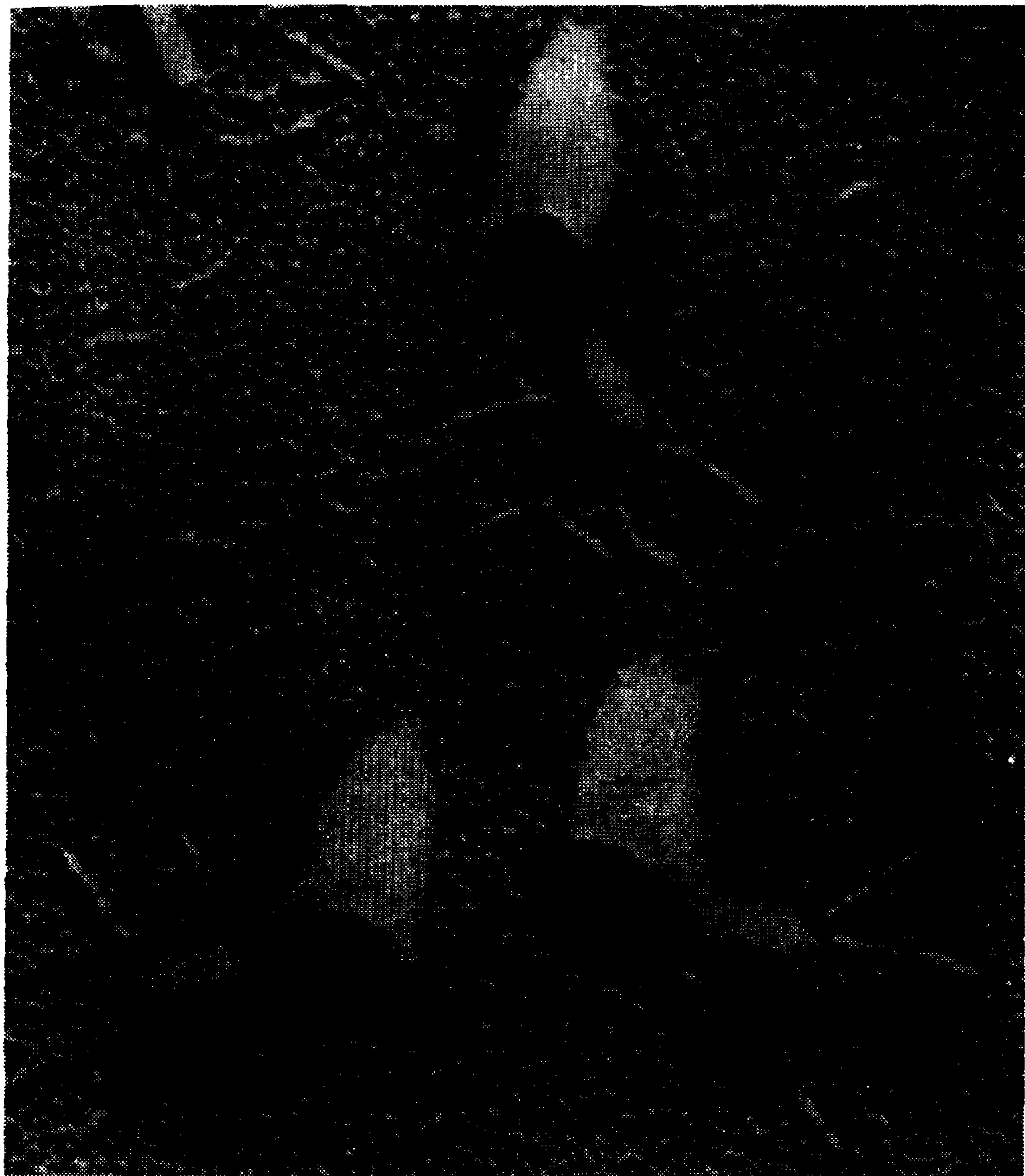


РИС. 3-10.

Электронная микрофотография бактериофага Т4 *E. coli*, полученная методом оттенения. Тени указаны стрелками. (Любезно предоставил Джонатан Кинг.)

Модификация метода напыления для наблюдения молекул нуклеиновых кислот, известная под названием метода Кляйншмидта, будет обсуждаться ниже.

Негативное контрастирование

Метод негативного контрастирования Бреннера и Хорна (часто неправильно называемый негативным окрашиванием) заключается в заливке мелких частиц или макромолекул сплошным сло-

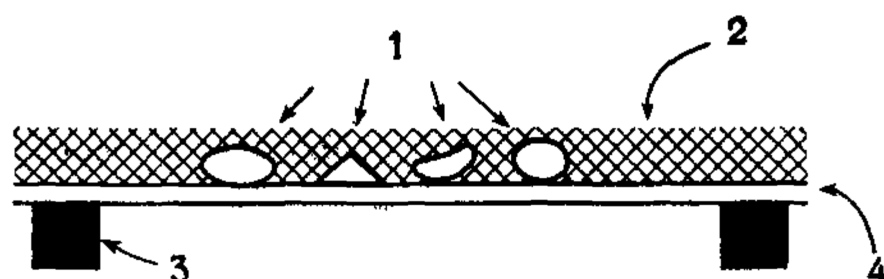


РИС. 3-11.

Метод негативного контрастирования.

Четыре частицы залиты материалом с высокой электронной плотностью. При прохождении электронного пучка через образец ослабление пучка будет зависеть от общей толщины слоя окрашивающего вещества, поэтому через участки, содержащие частицы, будет проходить большее количество электронов. *1* — частицы; *2* — материал с большой электронной плотностью; *3* — отверстие сетки; *4* — пленка-подложка.

ем красителя или погружении в пленку, непрозрачную для электронов (рис. 3-11). Краситель заполняет все промежутки, но не проникает внутрь частиц. Получаемое изображение соответствует относительной плотности луча в каждой точке, которая пропорциональна толщине слоя непрозрачного материала в этой точке. Таким образом, контраст достигается благодаря тому, что частицы понижают эффективную толщину непрозрачной пленки, т. е. частицы видны в виде их очертаний. На рис. 3-12 приведена электронная микрофотография фага, полученная методом негативного контрастирования. Для этого образец либо смешивают с красителем и этой смесью опрыскивают сетку, либо сетку опрыскивают раствором образца, а затем — раствором красителя. Иногда итерпретация негативно окрашенных образцов бывает затруднена, поскольку будут наблюдаться различные картины в зависимости от толщины слоя красителя, способности его проникать в промежутки между частицами, возможной специфической адсорбции его образцом (позитивное окрашивание) и от того, где находится краситель — над частицей или под ней. Это заставляет обычно исследовать большое число частиц при различных способах приготовления образцов. Все же метод негативного контрастирования успешно используется для широкого круга фагов, вирусов и белков.

Наиболее используемым красителем для негативного контрастирования является соль фосфорновольфрамовой кислоты, хотя имеются данные, что она может быть заменена иодистым кадмием. Следует иметь в виду, что разрешение в методе негативного контрастирования зависит от размера непрозрачных атомов (т. е. приблизительно в 5 Å).



РИС. 3-12.

Электронная микрофотография фага Т4 *E. coli*, полученная методом негативного контрастирования. Окрашивание проводили фосфорновольфрамовой кислотой. Сравните с рис. 3-10. (Любезно предоставил Джонатан Кинг.)

Позитивное контрастирование

Метод позитивного контрастирования для большинства макромолекул применяется относительно редко, поскольку обычно бывает невозможно присоединить достаточно большое число тяжелых атомов для получения хорошего контраста, хотя такая возможность имеется для очень больших молекул и структур, таких,

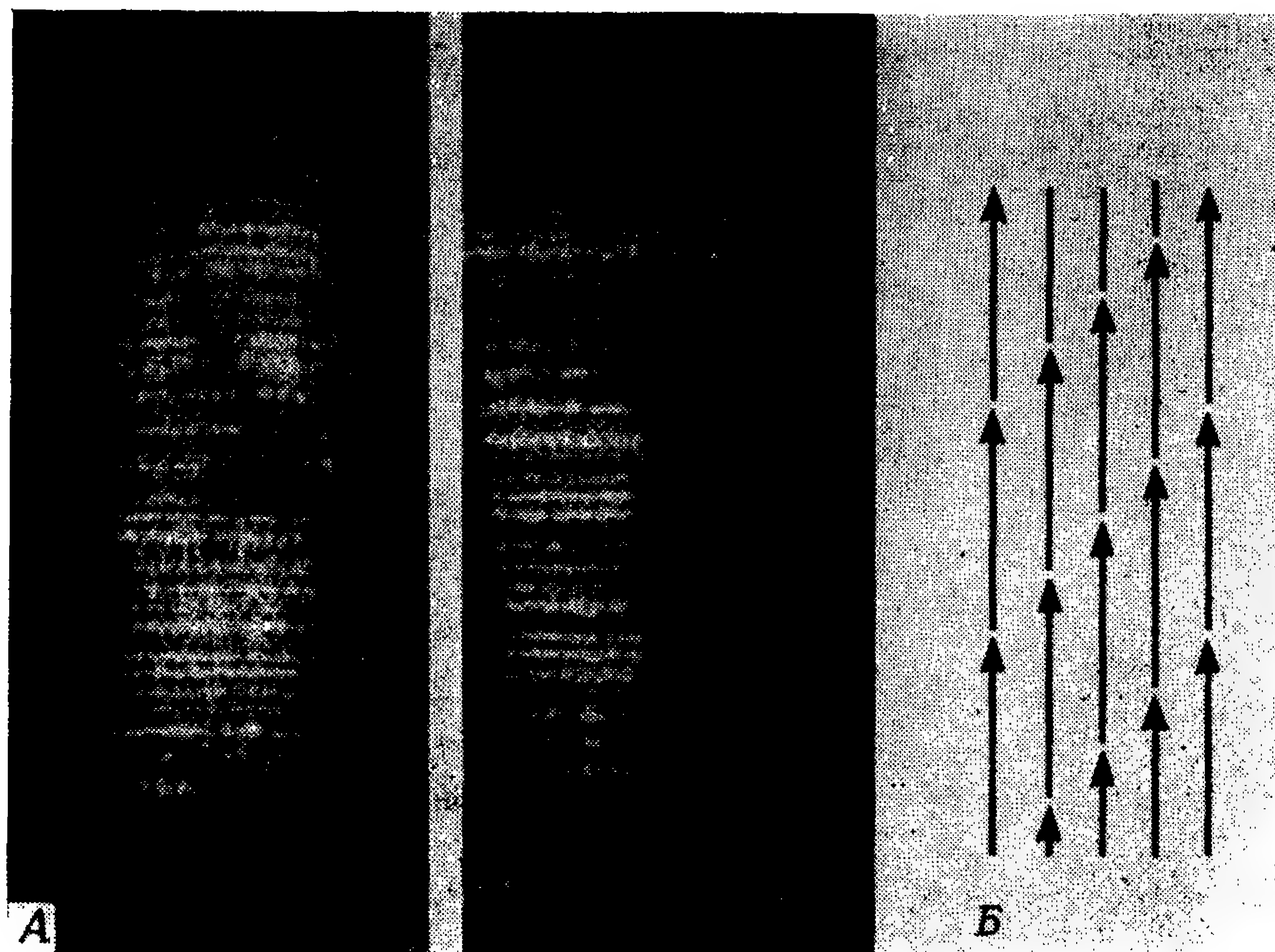


РИС. 3-13.

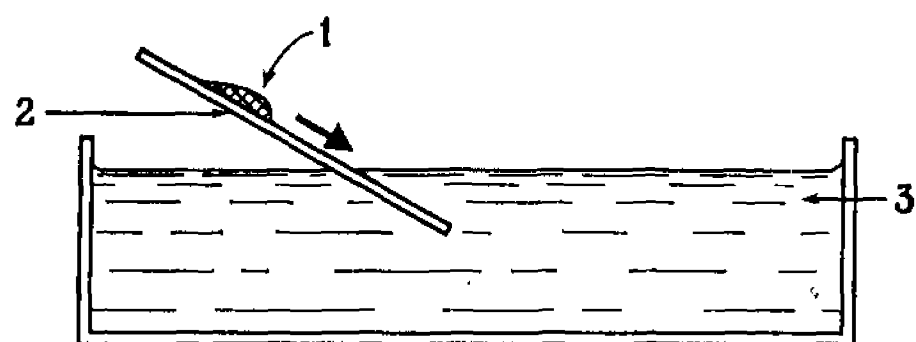
А — электронная микрофотография двух агрегатов молекул тропоколлагена, построенных по принципу сегмент — промежуток, при окрашивании фосфорновольфрамовой кислотой. Длина агрегата равна примерно 0,28 мкм. Зоны соответствуют частям тропоколлагена, связанным с красителем. (Любезно предоставил Питер Ф. Девисон.) *Б* — схематическое изображение волокна коллагена. Каждая стрелка соответствует молекуле тропоколлагена; молекулы соединены бок к боку, причем перекрывание составляет одну четверть длины каждой. Эта модель явилась результатом анализа расположения зон для этой и других форм коллагена. [*Hodge A. J., Highberger J., Deffner G., Schmitt F. O.*, Proc. Nat. Acad. Sci., **46**, 197 (1960).]

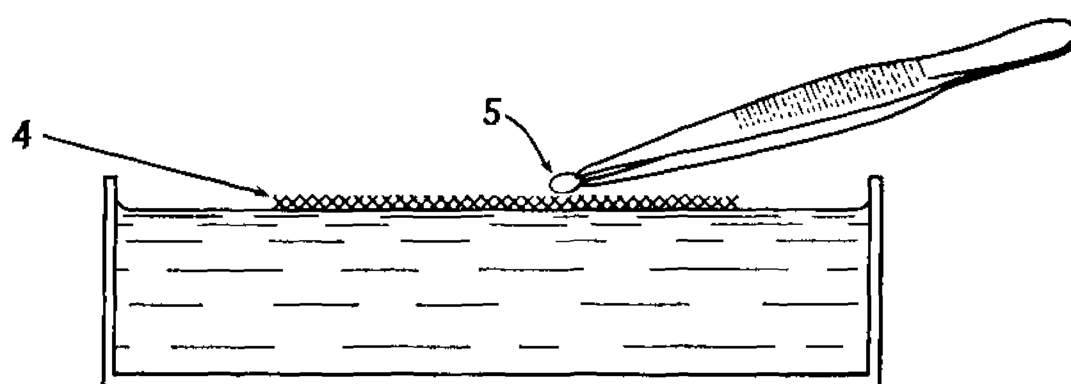
как рибосомы, ДНК, РНК-полимераза и коллаген. Особенно хорошие результаты получаются в случае коллагена; полученные при этом данные заслуживают особого внимания, так как демонстрируют большие аналитические возможности метода. При агрегации молекул тропоколлагена бок к боку с образованием коллагена полученная структура может быть окрашена фосфорновольфрамовой кислотой при pH 4,2 (связывание с положительно заряженными группами), в результате чего в электронный микроскоп видны группы полос (рис. 3-13). Если использовать уранилацетат, связывающийся с отрицательно заряженными группами, то расположение полос будет точно таким же. Поэтому агрега-

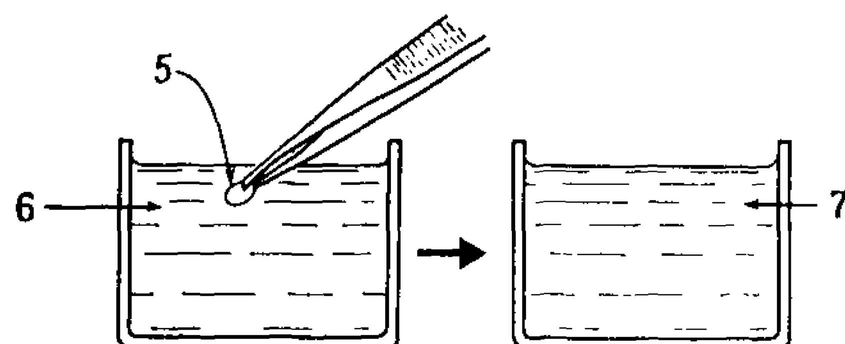
ция, вероятно, включает связывание положительно и отрицательно заряженных групп. Анализ расположения зон на электронных микрофотографиях некоторых типов коллагена показывает, что молекула тропоколлагена может образовывать волокна типа «голова к голове» и «голова к хвосту», причем стандартная структура агрегатов включает замещение одной четверти длины молекулы тропоколлагена следующей молекулой.

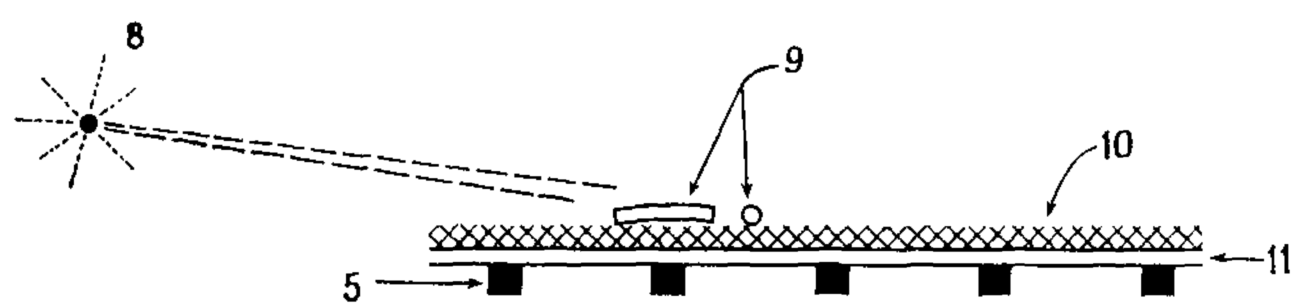
«Распластывание» по Кляйншмидту с позитивным контрастированием и круговым напылением

Вероятно, наиболее эффектным методом приготовления образцов из разработанных за последние десять лет является методика Кляйншмидта, позволяющая наблюдать молекулы ДНК. Основными достоинствами метода служат отсутствие артефактов, происходящих при высушивании, и получение исключительно контрастного изображения. Эта методика в настоящее время применяется почти в каждой биохимической лаборатории, причем для овладения ею достаточно всего лишь несколько часов. Каплю раствора ДНК в 0,5—1,0 М ацетате аммония, содержащем 0,1 мг/мл цитохрома *с*, наносят на стеклянную пластинку таким образом, чтобы она стекала по пластинке на поверхность 0,15—0,25 М ацетата аммония (рис. 3-14). Когда капля достигает поверхности, по поверхности начинает распространяться пленка денатурированного цитохрома *с*. Эта пленка содержит некоторое количество вытянутых молекул ДНК, связанных с толстым слоем (100—200 Å) денатурированного цитохрома *с*. Если поверхности пленки денатурированного белка коснуться сеткой, то к ней прилипнет капля, содержащая часть пленки. Если сетку с прилипшей каплей погрузить в спирт, водная фаза будет удалена, а пленка плотно свяжется с пленкой-подложкой на сетке. Используемая в настоящее время методика включает предварительное позитивное контрастирование уранилацетатом; белок, адсорбированный ДНК, будет окрашиваться так же, как образующая фон пленка, однако избыток белка позволяет получить хороший контраст. Контраст еще более увеличивается (или создается, если не применялось окрашивание) при напылении металла (обычно платины) под очень малым углом при одновременном вращении образца. Поскольку ДНК в образце покрыта пленкой белка, металл будет накапливаться у комплекса ДНК — белок подобно тому, как у забора наметает сугроб снега, однако это происходит со всех сторон, так как образец при напылении вращается. В результате получается исключительный контраст (рис. 3-15). Этот метод можно использовать для определения длины ДНК, а также для установления, является ли она кольцевой или же сверхспирализованной. В некоторых условиях (обычно при добавлении к


1
2
3
A


4
5
Б


5
6
7
В


8
9
10
5
11
Г

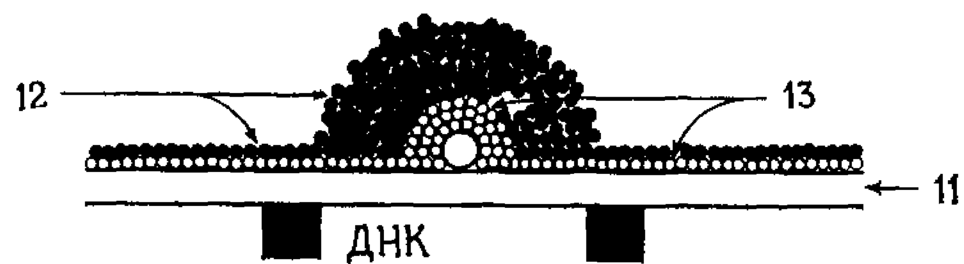

12
13
11
ДНК
Д

РИС. 3-14.

Подготовка образца ДНК по методу Кляйншмидта.

А — капля стекает вниз и образует на поверхности воды пленку белка; *Б* — пленка распространяется по поверхности. Сетку прижимают к поверхности пленки так, чтобы пленка-подложка на сетке пришла в соприкосновение с пленкой белка; *В* — образец обезвоживают погружением в этанол, а затем окрашивают уранилацетатом; *Г* — на сетку при вращении под очень малым углом напыляют металл; *Д* — увеличенное изображение цепи ДНК, покрытой цитохромом *с*, окрашенной и подвергшейся напылению испаряющимся металлом. *1* — капля (ДНК + цитохром *с* + 1,0 М ацетат аммония); *2* — стеклянная пластинка; *3* — нижний слой (0,15 М ацетат аммония); *4* — пленка цитохрома *с*, содержащего ДНК; *5* — сетка; *6* — этанол; *7* — раствор уранилацетата в этаноле; *8* — испаряющийся металл; *9* — цепи ДНК; *10* — пленка цитохрома *с*; *11* — пленка-подложка; *12* — напыленные атомы металла; *13* — цитохром *с* с атомами урана.

растворам формамида, обладающего денатурирующим действием) одноцепочечные полинуклеотиды становятся вытянутыми и их легко можно увидеть. Одноцепочечные ДНК и РНК отличаются от нативной ДНК по их относительной тонкости и скрученности (рис. 3-15).

В одном из вариантов метода, диффузионном методе, пленка цитохрома *с* образуется на растворе ДНК, и молекулы ДНК диффундируют по направлению к пленке, прилипая к ней. Этот процесс требует большего времени, однако дает возможность работать с гораздо меньшими концентрациями ДНК.

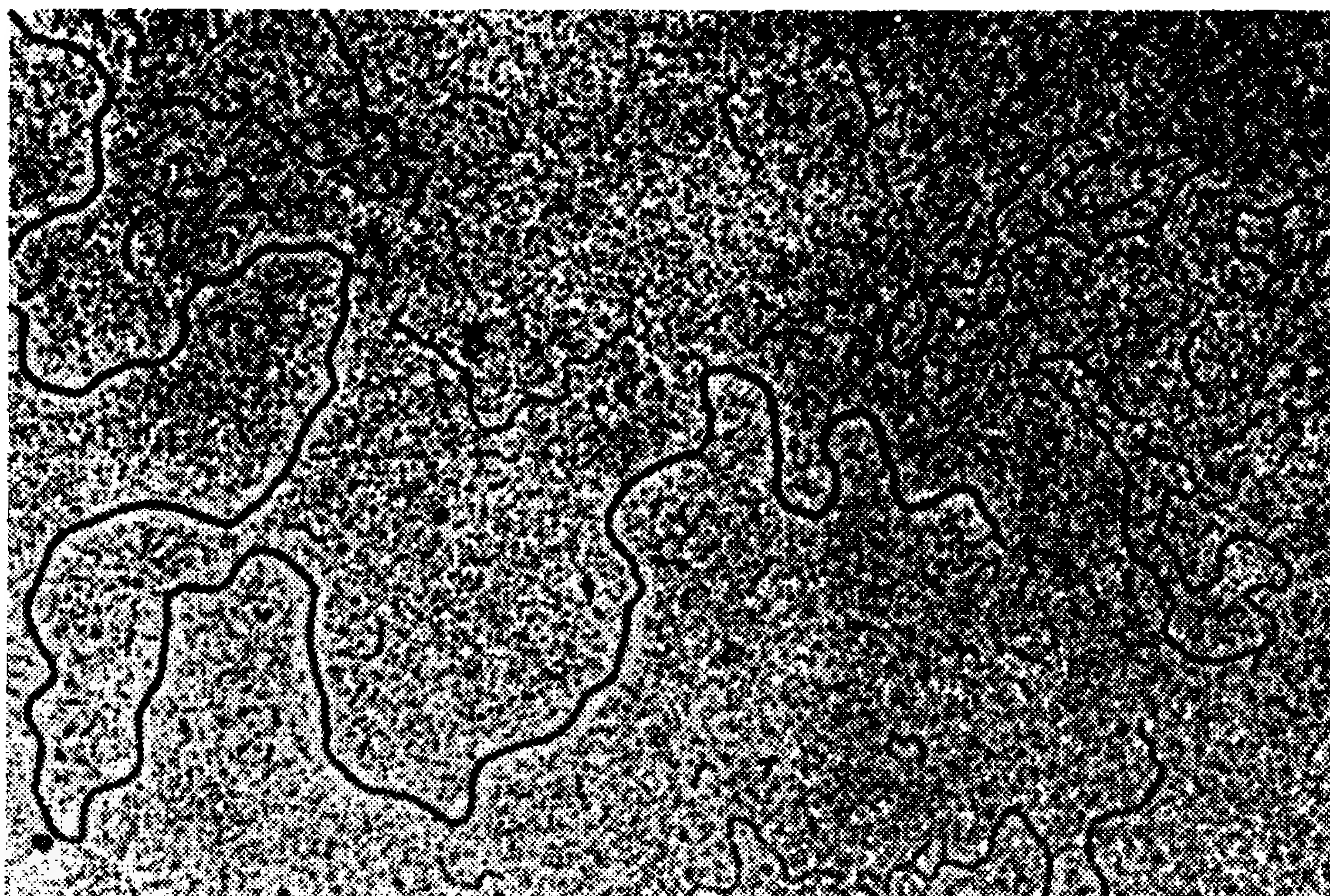
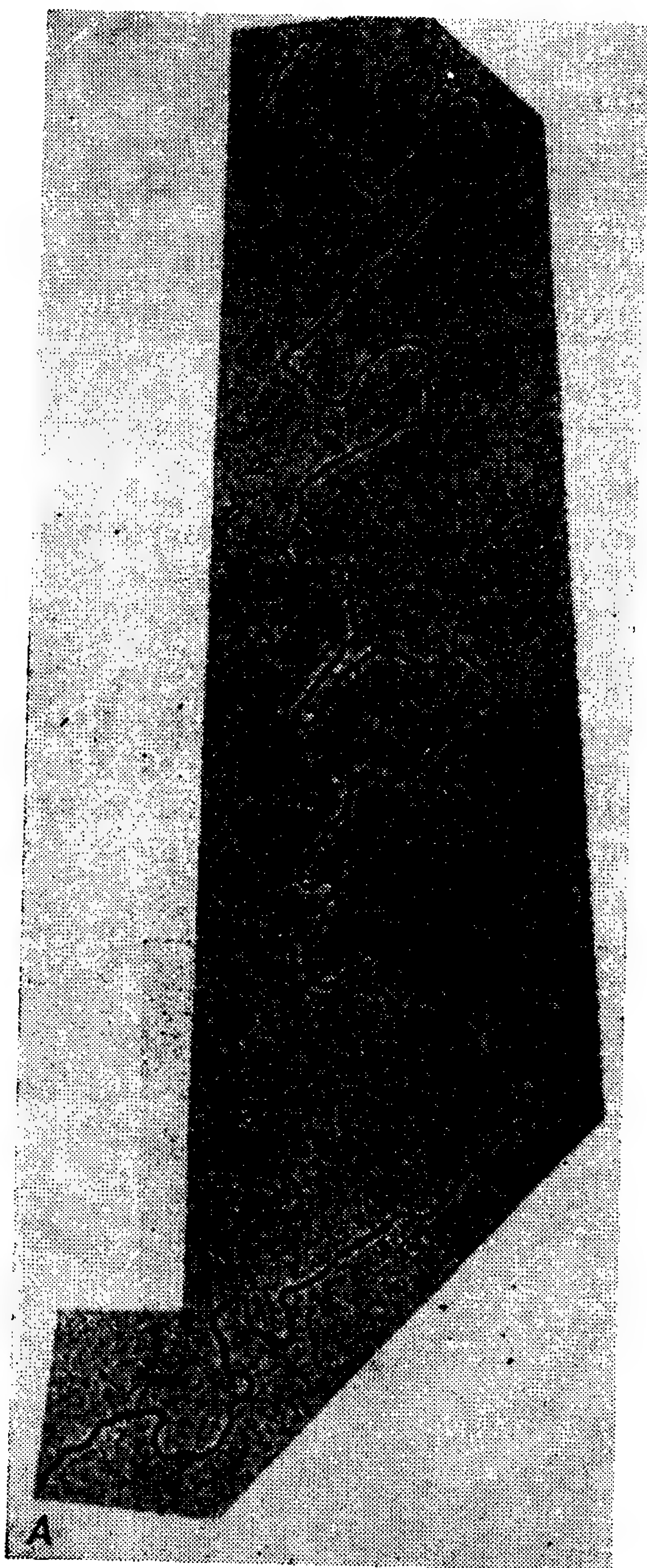


РИС. 3-15.

Электронная микрофотография двухцепочечной (*А*) и одноцепочечной (*Б*) ДНК, полученная методом Кляйншмидта. Обратите внимание, что одноцепочечная ДНК более извилистая, чем двухцепочечная.



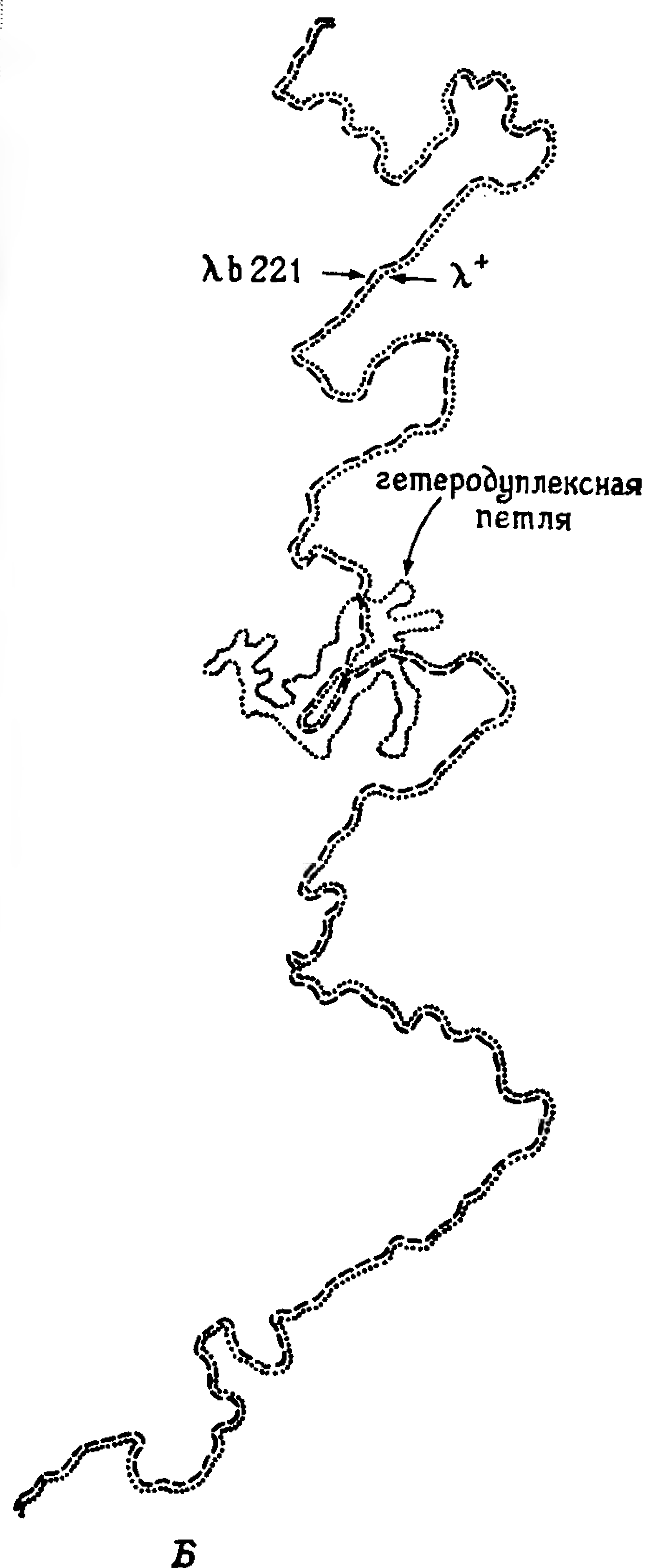


РИС. 3-16.

А — электронная микрофотография гетеродуплекса фагов λ+ и λb221 (фаг делеции); ДНК денатурировали и ренатурировали. *Б* — штриховая линия, соответствует однотяжевой ДНК λb221. Точечная линия показывает однотяжевую ДНК λ+. Гетеродуплексная петля представляет собой часть λ+, отвечающую делеции λb221. (Любезно предоставил Мануэль Валенсуела.)

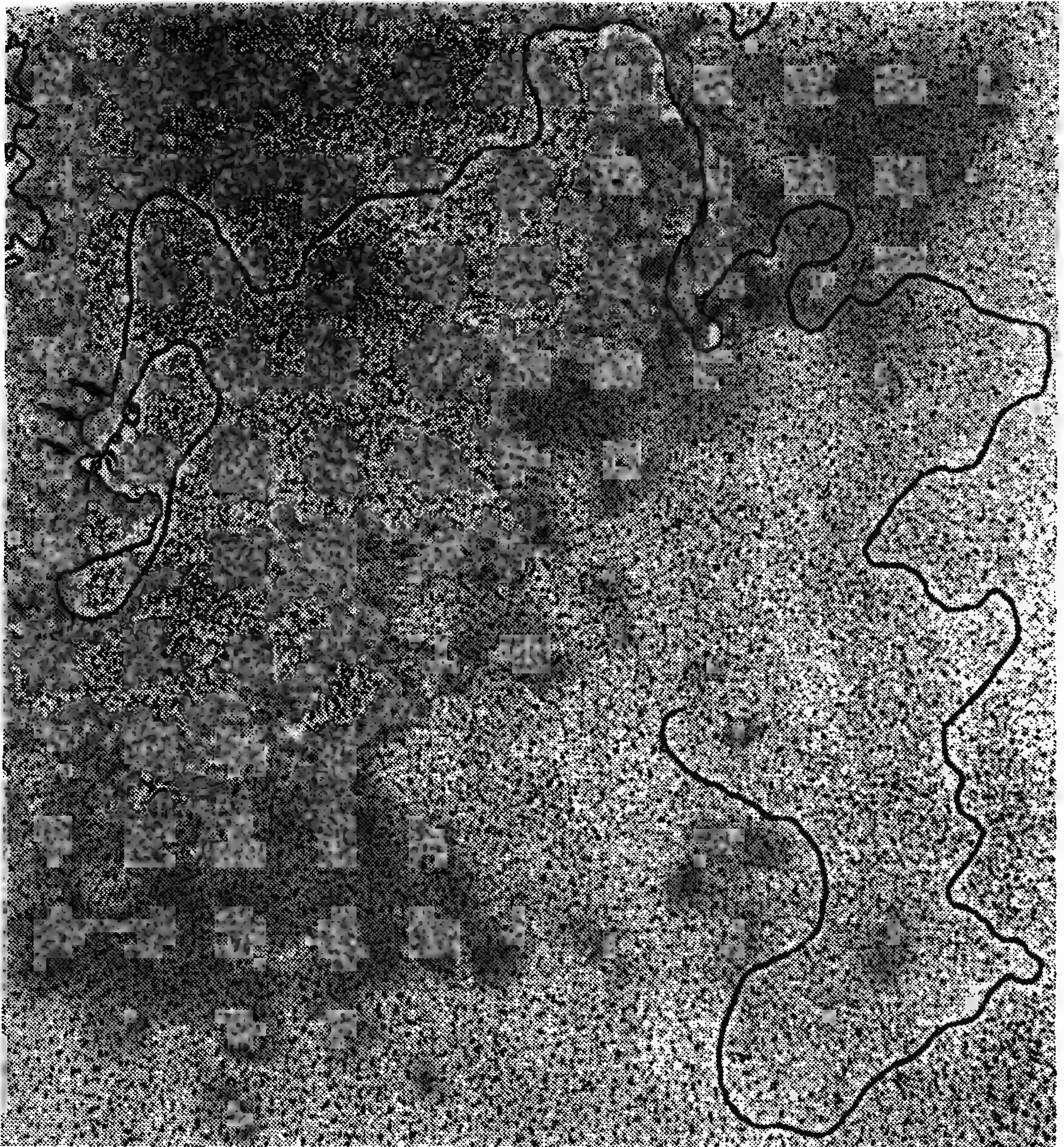


РИС. 3-17.

Электронная микрофотография ДНК с использованием хлорида бензалкония [метод описан в Proceedings of the National Academy of Sciences, 72, 83 (1975)].

Молекулы, полученные этим методом, выглядят тоньше, чем в случае методики Кляйншмидта. В результате хорошо видны молекулы связанного белка. На этой микрофотографии изображены три сферические молекулы РНК-полимеразы (указаны стрелками), связанные с ДНК фага T7 *E. coli*. Ширина микрофотографии соответствует приблизительно 3 мкм. (Любезно предоставил Т. Коллер.)

Одной из важных разновидностей методики Кляйншмидта является *гетеродуплексный метод*. Он состоит в том, что однотяжевые молекулы различных ДНК подвергают гибридизации (гл. 18). Гомологичные участки (т. е. участки, содержащие комп-

лементарные последовательности оснований) выглядят как двухцепочечная ДНК, тогда как негомологичные участки остаются в виде одноцепочечных петель (рис. 3-16).

Недавно был разработан еще один вариант метода Кляйншмидта, в котором цитохром *с* заменен хлоридом бензалкония — поверхностно-активным веществом, которое также образует пленку, способную прилипать к ДНК. На ДНК напыляют платину, но в связи с тем, что ДНК здесь не покрыта слоем белка, она выглядит гораздо у́же, чем с применением цитохрома *с*. Позитивное контрастирование проводится так же, однако атомы урана связываются непосредственно с ДНК. Эта процедура дает гораздо лучшее разрешение макромолекул (например, РНК-полимеразы), связанных с ДНК, и, вероятно, этот метод ждет большое будущее (рис. 3-17).

Специальные способы получения изображения

Электронная микроскопия темного поля

Электронная микроскопия темного поля позволяет значительно увеличить контраст, так же как в случае оптического микроскопа. Темное поле можно получить либо путем освещения пучком электронов в виде полого конуса, как в оптической микроскопии (гл. 2), либо направляя пучок электронов на образец под таким углом, чтобы он не попадал в систему получения изображения. В результате изображение получается только за счет рассеяния и дифракции электронов. Электронная микроскопия темного поля используется не слишком широко, однако она заслуживает самого пристального внимания в случае макромолекул. Простой пример демонстрирует возможности метода.

Пример 3-А. *Связывание белков с ДНК.* ДНК имеет диаметр 20 Å, однако после нанесения слоя цитохрома *с* по методу Кляйншмидта диаметр ее возрастает до приблизительно 200 Å. Для наблюдения центра связывания белка с ДНК белок должен иметь размеры более 100 Å, в противном случае он будет теряться на фоне цитохрома *с*, покрывающего ДНК. Однако, если использовать ультратонкие пленки-подложки, несущие электрический заряд, ДНК или ДНК вместе со связанным белком будет выходить из водного раствора без участия поддерживающей белковой пленки. Как ДНК, так и молекула интересующего белка могут быть положительно окрашены уранилацетатом. Однако, хотя пленка-подложка не окрашивается, контраст будет невысоким, поскольку в отсутствие цитохрома *с* общее количество связанного

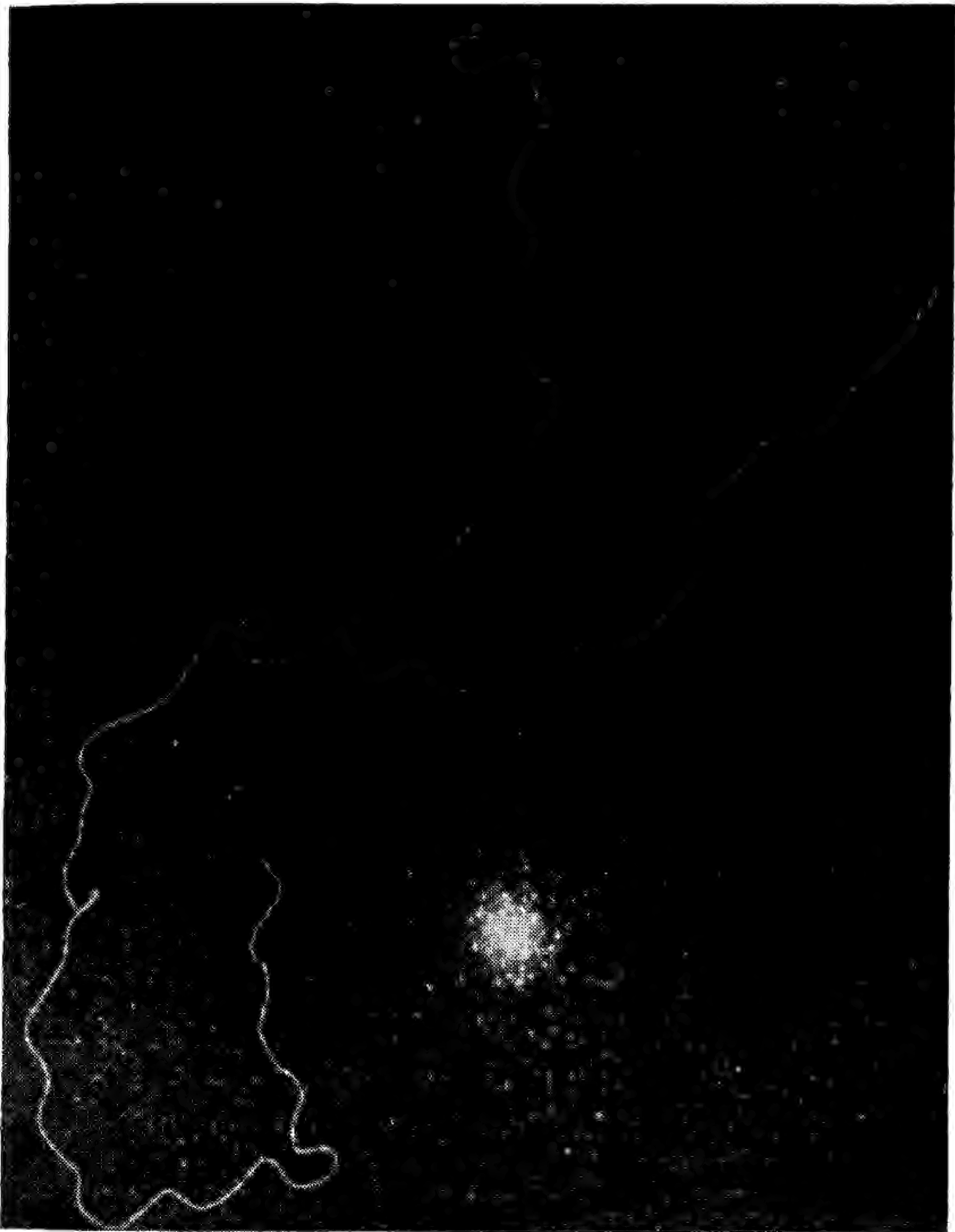


РИС. 3-18.

Электронная микрофотография на темном поле ДНК фага Т7 *E. coli* в процессе репликации (*Dressler D.*, in "Control Processes in Virus Multiplication", ed. by D. C. Burke and W. C. Russel, Cambridge University Press, 1975).

урана невелико. При использовании обычного освещения молекулы ДНК практически нельзя увидеть. Однако они хорошо видны при использовании метода темного поля, поскольку в этом

случае фон не освещается. Электронная микрофотография молекулы ДНК, полученная методом темного поля, показана на рис. 3-18.

Следует заметить, что метод темного поля не увеличивает разрешающей способности микроскопа, а только позволяет избежать некоторых явлений при подготовке образца, которые не дают полностью проявиться разрешающей способности микроскопа. Пока еще остается непонятным, в чем заключаются относительные достоинства метода темного поля по сравнению с вариантом использования хлорида бензалкония.

Микроскоп Крева

В обычном электронном микроскопе падающий пучок электронов покрывает весь образец. Существует несколько типов взаимодействия электронов с образцом: 1) отсутствие взаимодействия (т. е. прохождение через межатомные пространства) — наиболее распространено; 2) упругое рассеяние (без потери энергии) орбитальными электронами атомов образца — также встречается достаточно часто; 3) неупругое рассеяние (с потерей энергии) ядрами атомов — встречается реже. Соотношение последних двух видов взаимодействия является характеристическим для каждого элемента, так как для каждого характерен определенный размер ядерной мишени и для более тяжелых элементов, следовательно, увеличивается доля неупругого рассеяния.

Исходя из этого был разработан новый специальный тип микроскопа. В нем пучок сжимается до очень малого (приблизительно 5 Å) пятна. Это пятно быстро обегает образец, подобно тому как это делает луч на экране телевизора. При движении пучка измеряется соотношение электронов двух последних видов в каждой точке с помощью спектрометра энергии электронов. Полученное соотношение преобразуется в изображение на телевизионном экране соответствующим электронным устройством; полученная информация обрабатывается компьютером. Это новый важный шаг вперед в электронной микроскопии, дающий новый элемент анализа, поскольку здесь возможна идентификация индивидуальных атомов. В некоторых случаях предельное разрешение удается довести до 2 Å. На рис. 3-19 приведены микрофотографии некоторых молекул, полученные этим методом.

Сканирующий микроскоп обратного рассеяния

Сканирующий электронный микроскоп представляет собой прибор, который в течение последних нескольких лет позволил получить множество прекрасных микрофотографий клеточных поверхностей. Разрешение микроскопа ограничено 200 Å, причем

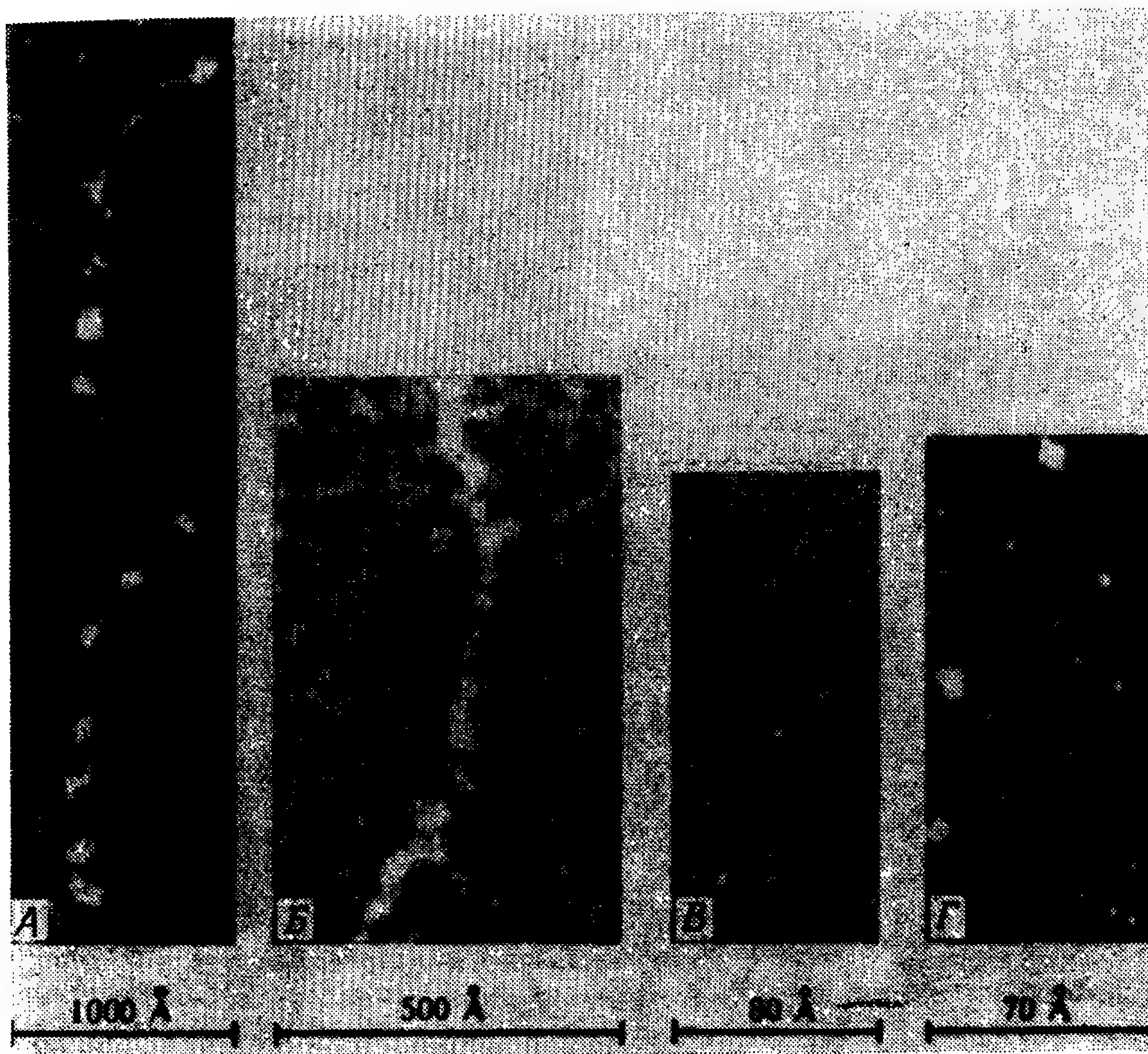


РИС. 3-19.

А — электронная микрофотография хроматина тимуса теленка, обедненного гистоном (H1) с высоким содержанием лизина. Видно, что волокна ДНК шириной 20—30 Å покрыты частицами белка со средним диаметром 135 Å на расстоянии приблизительно 260 Å друг от друга [*Langmore J. P., Wooley J.*, Proc. Nat. Acad. Sci., 72, 2691—2695 (1975)]. *Б* — часть неокрашенной молекулы ДНК фага Т7, представляющая собой волокно толщиной 20—30 Å. *В* — атомы ртути. *Г* — атомы урана. (Все микрофотографии получены с помощью сканирующего электронного микроскопа Крева с пропусканием и любезно предоставлены Джоном Лангмором и Альбертом Кревом.)

он работает по совершенно другому принципу по сравнению с обычным электронным микроскопом. Подобно микроскопу Крева, пучок здесь сжимается в маленькое (100 Å) пятно, которое обегает поверхность образца, покрытого толстым (200 Å) слоем золота или другого тяжелого металла. Когда пучок падает на металл и проходит в нем короткое расстояние, золото начинает испускать электроны вследствие вторичной эмиссии или прямо электроны пучка за счет обратного рассеяния. Поскольку угловое соотношение между числом испускаемых электронов и углом

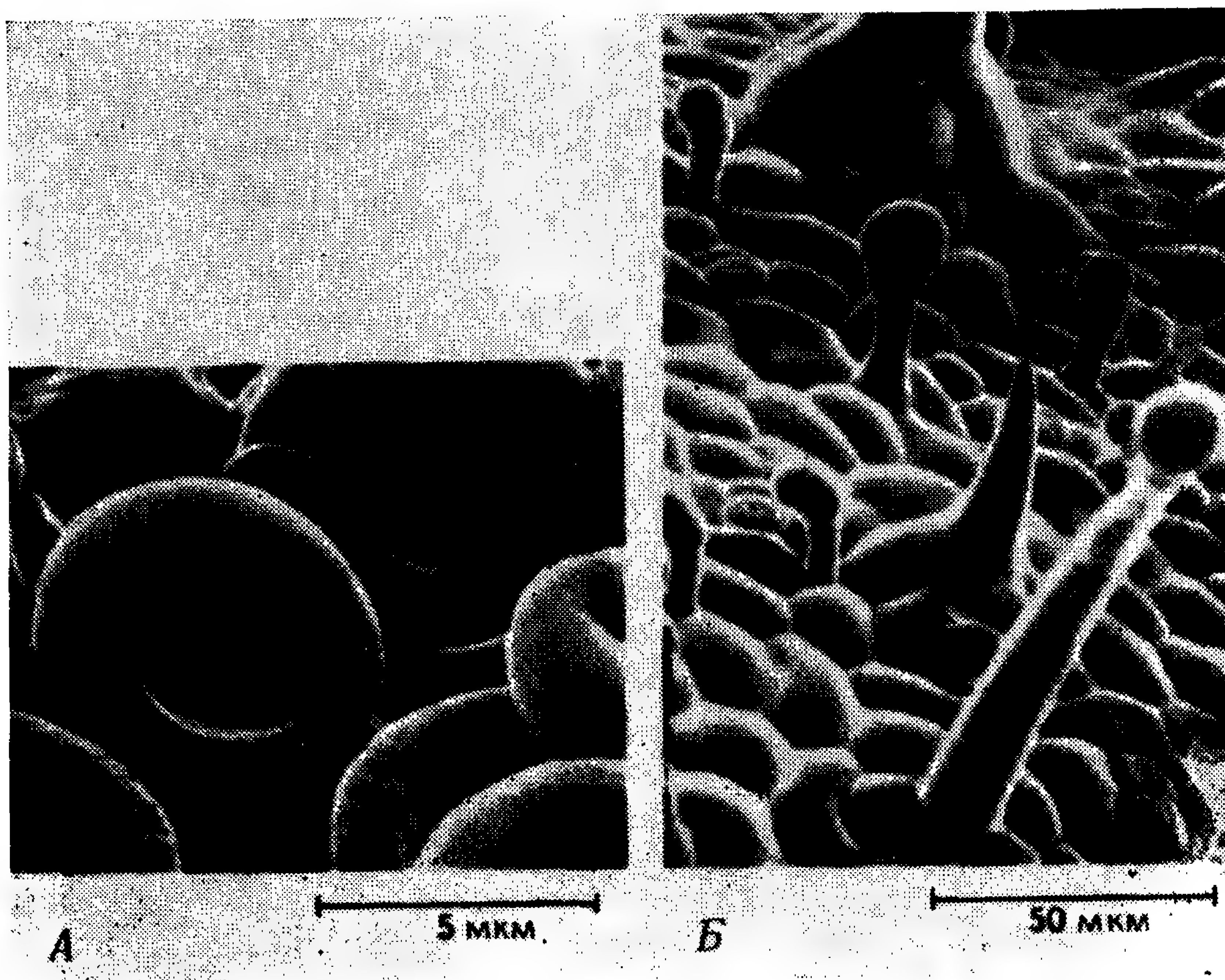


РИС. 3-20.

Сканирующая электронная микрофотография эритроцитов крови человека (*А*) и поверхности листа герани (*Б*). (Любезно предоставил Томас Хайес.)

между поверхностью и падающим пучком неожиданно очень близко, но не идентично тому, которое существует для отражения света от поверхности объекта, изображение, полученное при регистрации электронов, дает картины исследуемых поверхностей клеток. Пример сканирующей электронной микрофотографии приведен на рис. 3-20.

Список литературы

Crewe A. V., A High-Resolution Scanning Electron Microscope, Sci. Amer., 224 (4), 26—35 (1971).

Davis R. W., Simon M., Davidson N. G., Electron Microscope Heteroduplex Methods for Mapping Base Sequence Homology in Nucleic Acid, in "Methods in Enzymology", vol. 21, edited by L. Grossman and K. Moldave, Academic Press, 1971, pp. 413—428.

Greenstone A., The Electron Mircoscope in Biology, St. Martin's Press, 1968.

Haggis G. H., The Electron Microscope in Molecular Biology, Wiley, 1967.

Hall C. E., Introduction to Electron Miroscopy, McGraw-Hill, 1966.

Kleinschmidt A. K., Monolayer Techniques in Electron Microscopy of Nucleic

Acid Molecules, in "Methods in Enzymology", vol. 12B, edited by L. Grossman and K. Moldave, Academic Press, 1968, pp. 361—376.

Oliver R. M., Negative Stain Electron Microscopy of Protein Macromolecules, in "Methods in Enzymology", vol. 27, edited by C. H. W. Hirs and S. N. Timasheff, Academic Press, 1973, pp. 616—672.

Slayter E. M., Optical Methods in Biology, Wiley, 1970.

Задачи

3-1. Образец РНК-содержащих вирусов наблюдали методом негативного контрастирования. При этом обнаружено два типа частиц — равномерно светлые на темном фоне и имеющие большие темные центры. Какова структура каждой из них?

3-2. Сферический вирус был смешан со сферами из полистирола диаметром 750 Å. После напыления слоя золота длина тени полистироловых сфер составила 1250 Å, а вируса — 820 Å. Чему равен диаметр вируса? Некоторые вирусы имеют тени в пределах от 150 до 200 Å. Каковы их размеры?

3-3. ДНК № 1 имеет длину 10 мкм, № 2 — 9,5 мкм. Бо́льшая часть их молекул состоит из идентичных последовательностей оснований. Участок от 4,0 до 4,5 мкм (измерен от конца, который условились считать левым) № 1 отсутствует в № 2. Участок от 7,1 до 7,8 мкм в № 1 заменен в № 2 последовательностью, которой нет в № 1. Эти ДНК смешивали, денатурировали и ренатурировали в соответствии с гетеродуплексной методикой. Как будут проявляться гетеродуплексы?

3-4. Образец линейной двухцепочечной ДНК (все молекулы идентичны) подвергали непродолжительной обработке экзонуклеазой, атакующей только 5′-концы цепочек ДНК до тех пор, пока не расщепилось приблизительно 3% ДНК. Известно, что эти молекулы обладают концевой избыточностью, т. е. ген имеет последовательность ABCD...XYZABC, причем длина сегмента ABC составляет 1% от общей длины ДНК. Если эти обработанные молекулы поместить в ренатурирующие условия, то получится новый тип структуры. Опишите эту структуру, указав длины различных участков в процентах от первоначальной длины.

3-5. Белок состоит из 60 сферических субъединиц, расположенных таким образом, что 6 составляют шестиугольник, а 10 шестиугольников упакованы в виде стопки один над другим. Опишите типы структур, которые будут наблюдаться: (*А*) при негативном контрастировании, (*Б*) измерении тени и (*В*) при использовании реплики.

3-6. Пленки-подложки обычно получают из пластика или чистого углерода. Они очень хрупки и часто ломаются. Более прочные пленки можно получить из таких металлов, как хром. Почему же не используются металлические пленки? Объясните.

3-7. При измерении длины молекул ДНК необходимо измерить длины достаточно большого числа молекул, чтобы получить статистически достоверный результат. Ясно, что чем бо́льшие молекулы изучаются, тем меньше их будет приходиться на отверстие в сетке. Одним из решений этой проблемы является увеличение концентрации ДНК. Объясните, почему это неразумно, если длина молекул превышает, скажем, 20 мкм?

3-8. Клетки, инфицированные вирусом, имеют диаметр примерно 50 мкм. Тонкий слой, толщиной 100 Å, содержит 22 вируса диаметром приблизительно 400 Å. Сколько ориентировочно вирусов находится в этой клетке? Из какого предположения вы исходили, проводя свой расчет?

3-9. Данная клетка имеет примерно цилиндрическую форму длиной 10 мкм и диаметром 1 мкм. Она содержит набор дисков, упакованных в виде стопки по оси цилиндра диаметром 1 мкм и 400 Å в длину. Ряд клеток заливали пластиком, разрезали на срезы толщиной 200 Å и окрашивали тяжелым металлом. Какие типы структур можно будет увидеть?

II ЧАСТЬ

ОБЩИЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ

ГЛАВА 4

Измерение pH

Поскольку практически все биохимические реакции сильно зависят от pH (значение pH определяется как $-\lg[H^+]$), важно иметь возможность точного измерения pH. Это можно осуществить с помощью коммерческих pH-метров простым погружением двух электродов в раствор и считыванием значения pH со шкалы. Необходимо, однако, знать, какие факторы влияют на точность показаний pH-метров, поскольку некоторые из них могут обусловить отличие наблюдаемого значения pH от истинного.

При помощи pH-метра измеряют разность потенциалов между двумя электродами, помещенными в раствор. Основой такой системы служит электрод, потенциал которого зависит от pH. Чаще всего используют в качестве такой pH-зависимой ячейки *стеклянный электрод*. Принцип действия такого электрода основан на том, что некоторые типы боросиликатного стекла проницаемы для H^+-ионов, но непроницаемы для любых других катионов или анионов. Поэтому, если тонкий слой такого стекла поместить между двумя растворами с различными концентрациями ионов H^+, эти ионы будут диффундировать сквозь стекло из раствора с высокой концентрацией ионов водорода в раствор с низкой их концентрацией. Поскольку проходящий через стекло H^+-ион прибавляет положительный ион к раствору с низкой концентрацией H^+ и оставляет после себя отрицательный ион, по обе стороны стекла развивается разность потенциалов, величина которого дается уравнением

$$E = 2{,}303\,\frac{RT}{F}\lg\frac{[H^+]_1}{[H^+]_2}, \qquad (1)$$

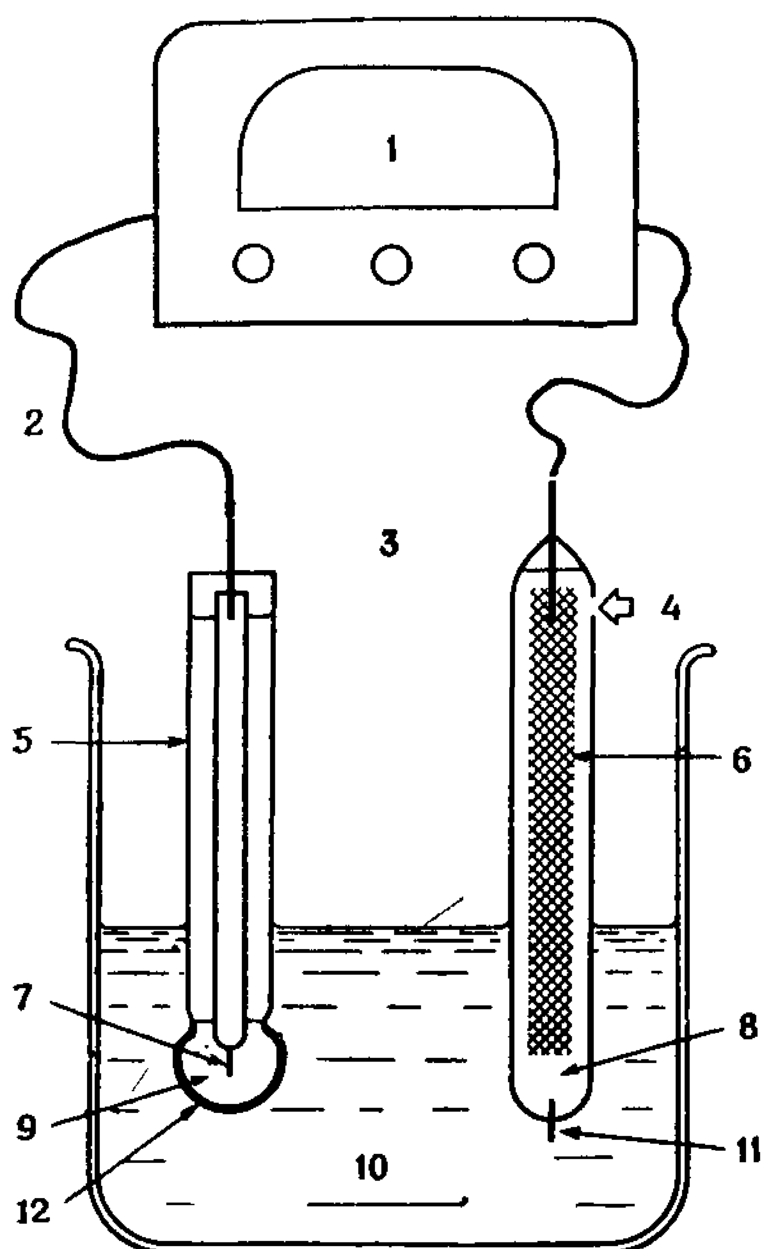


РИС. 4-1.

Стеклянный электрод и электрод сравнения в pH-метре.

1 — измерительный прибор; *2* — стеклянный электрод; *3* — электрод сравнения (каломельный); *4* — открытое отверстие для предотвращения влияния изменений атмосферного давления; *5* — обычное стекло; *6* — каломель ($Hg/HgCl_2$ в насыщенном растворе KCl); *7* — серебряная проволока, покрытая AgCl; *8* — насыщенный KCl; *9* — 0,1 н. HCl; *10* — раствор; *11* — волокно или капилляр; *12* — стекло, проницаемое для ионов водорода.

где E — потенциал, R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, F — постоянная Фарадея, $[H^+]_1$ и $[H^+]_2$ — концентрации ионов водорода у наружной и внутренней сторон стекла соответственно. Ясно, что, если концентрация H^+ одного из растворов постоянна, потенциал будет пропорционален pH второго раствора.

Схема стеклянного электрода показана на рис. 4-1. Стеклянный электрод содержит 0,1 н. HCl в контакте со стеклом, проницаемым для H^+-ионов. Присоединение к вольтметру осуществляется при помощи покрытой хлоридом серебра проволоки, которая погружена в HCl.

Цепь завершается при погружении в раствор электрода сравнения (рис. 4-1), который чаще всего содержит пасту $Hg/HgCl_2$ в насыщенном растворе KCl; такой электрод называется *каломельным*. Если измерения требуется проводить при высоких температурах, вместо $Hg/HgCl_2$ применяют Ag/AgCl. В обоих случаях KCl служит для создания контакта между $Hg/HgCl_2$- или Ag/AgCl-полуэлементом и раствором, в котором проводится измерение. Такой полуэлемент помещается в стеклянный корпус, непроницаемый для H^+-ионов (таким образом, его потенциал *не* зависит от pH). Электрический контакт между раствором KCl внутри электрода сравнения и измеряемым раствором осущест-

вляется с помощью тонкой нити или капилляра в стеклянном корпусе. (KCl медленно перетекает в раствор пробы. В случаях, когда присутствие Cl^--иона нежелательно, используют электрод сравнения $Hg/HgSO_4$.)

Напряжение, измеряемое такой системой, является прежде всего разностью потенциалов между стеклянным электродом и электродом сравнения. Однако в цепи имеется три других потенциала: 1) так называемый жидкостной диффузионный потенциал в электроде сравнения, обусловленный тем, что ионы K^+ и Cl^- диффундируют с неодинаковой скоростью, так что на поверхности раздела между раствором KCl в электроде сравнения и раствором пробы возникает заряд; 2) малоизученный потенциал, называемый потенциалом асимметрии, который возникает в стекле даже в том случае, когда pH растворов по обе стороны от него одинаков; 3) потенциал Ag/AgCl в стеклянном электроде, который сам по себе является электродом вследствие контакта с ионами Cl^- в растворе HCl. Эти три потенциала и потенциал электрода сравнения практически независимы от pH и ионной силы (в обычно встречающихся пределах), и поэтому их можно рассматривать как постоянные ($E_{фикс}$). Следовательно, э. д. с. V измеряемой системы в целом может быть выражена как разность между постоянными потенциалами и потенциалом стеклянного электрода:

$$V = E_{фикс} - \frac{2,303RT}{F} \lg \frac{[H^+]_1}{[H^+]_2}. \qquad (2)$$

Поскольку стеклянный электрод обычно заполнен 0,1 н. HCl

$$[H^+]_1 = 10^{-1}$$

и поскольку $pH = -\lg[H^+]$,

$$V = F_{фикс} + \frac{2,303RT}{F} - \frac{2,303RT}{F} pH,$$

или

$$V = \text{const} - \frac{2,303RT}{F} pH. \qquad (3)$$

Отсюда возникающее напряжение линейно связано с pH раствора.

Чтобы избежать определения констант в уравнении (3) и, *следовательно, концентрации HCl в стеклянном электроде, которая может изменяться при неоднократном использовании,* pH-метры обычно стандартизуют, применяя для этого раствор с заведомым pH. (Концентрация KCl в электроде сравнения не изменяется, так как раствор насыщен и содержит нерастворенные кристаллы.) Для этого электроды помещают в стандартный бу-

фер (обычно берут буферы с pH 4, 7 и 10) и прибор регулируют так, чтобы показание соответствовало pH стандарта. Такой стандартизации достаточно. Однако, поскольку небольшие изменения вызывают некоторую нелинейность, для точного определения pH рекомендуется использовать стандарт, pH которого отличается от pH неизвестного раствора не более чем на 1—2 единицы.

Как видно из уравнения (3), соотношение между измеряемым напряжением и действительным pH зависит от температуры*. Поэтому при определении pH следует отрегулировать pH-метр на температуру измеряемого раствора (с помощью ручки, обычно обозначаемой «Темп» или «Контроль компенсации температуры»). Это позволяет регулировать сопротивление в электрической цепи таким образом, чтобы изменение напряжения на единицу pH было постоянным. Здесь, несомненно, важно то, что само измерение не вызывает изменений температуры, поскольку температурная зависимость такая же, как и влияние температуры на ионизацию. Это замечание приводится потому, что температура может повышаться во время измерения в результате прохождения тока через раствор. Однако, поскольку стеклянный электрод обладает очень большим сопротивлением, через вольтметр протекает очень слабый ток. Более того, раствор, в котором проводится измерение, обычно имеет очень низкое сопротивление, так что изменение температуры (пропорциональное сопротивлению, времени и квадрату величины тока) за короткий интервал очень мало.

Осложнения при измерении pH

Зависимость pH от концентрации ионов

pH буфера зависит не только от концентрации ионов в буфере, но и от термодинамического параметра, называемого активностью. Эта величина сильно зависит от общей концентрации ионов в растворе (фактически от ионной силы), так что pH буфера будет изменяться как в зависимости от его собственной концентрации, так и при изменении концентрации других солей в растворе. Это особенно важно при использовании коммерческих стандартов pH, поскольку они обычно выпускаются в виде концентрированных растворов, которые требуется разбавлять в 25 раз, — этот фактор разбавления должен строго соблюдаться. Сходным

* Здесь важно понять, что температурная зависимость не является той зависимостью, которая вызывает изменения pH буфера с температурой,— этот эффект является результатом зависимости от температуры константы диссоциации кислоты, тогда как данная зависимость отражает влияние температуры на потенциал.

образом, если буферный раствор был приготовлен в виде концентрата (иными словами, запасной раствор), pH этого раствора не соответствует значению, требуемому для разбавленного раствора. Поэтому концентрированный раствор должен быть приготовлен таким образом, чтобы при разбавлении до концентрации, необходимой для конкретного эксперимента, измеряемое значение pH соответствовало требуемому.

Загрязнение и нарушение показаний электродов

Некоторые вещества способны адсорбироваться на H^+-проницаемом стекле стеклянного электрода и тем самым влияют на проникновение ионов H^+, вызывая искажение показаний. Это часто случается в растворах белков, так как на стекле может образовываться тонкая пленка белка. К счастью, такая пленка легко удаляется при обработке детергентом или кислотой.

Обычно используемый трис-буфер [*трис*-(оксиметил)аминометан], как установлено, реагирует с компонентами некоторых коммерческих электродов. При этом наблюдается ошибка, достигающая иногда единицы pH. Фирмы-изготовители обычно указывают в своих каталогах, какие электроды могут быть использованы для работы в трис-буфере.

Натриевая ошибка

Стеклянные электроды общего назначения почти всегда в некоторой степени проницаемы для ионов натрия. Поэтому потенциал, соответствующий концентрации Na^+, может возникать тем же путем, что и для H^+-ионов. Если в растворе, где определяется pH, присутствует Na^+, то измеряемое значение pH уменьшается с увеличением концентрации Na^+, поскольку электрод определяет сумму концентраций Na^+ и H^+. Следовательно, $[H^+]$ может *казаться* больше, так как наблюдаемое значение pH ($-\lg[H^+$ *и* $Na^+]$) меньше, чем действительное значение pH ($-\lg[H^+]$). Такой эффект особенно заметен при высоких pH (когда используется NaOH) и может составлять одну — две единицы pH в 1 M растворе Na^+. Это важно помнить из-за вездесущего характера ионов натрия.

Выпускаются специальные Na^+-непроницаемые стеклянные электроды, которые можно использовать для предотвращения натриевой ошибки в тех случаях, когда присутствие ионов Na^+ необходимо. С другой стороны, поскольку проницаемость стекла для ионов других щелочных металлов (например, K^+) очень мала, натриевая ошибка может быть предупреждена применением калиевых солей. Если же необходимо работать при высоких значениях pH, то лучше всего вместо NaOH использовать KOH.

Следует заметить, что часто приходится сталкиваться с утверждением, будто электроды общего назначения при высоких pH дают заниженное значение. Это не совсем верно, поскольку осложнения вызываются не OH^-, а Na^+. Так называемые электроды высоких pH являются обычными стеклянными электродами, изготовленными из стекла, непроницаемого для Na^+.

Проблема трис-буфера

Трис-буфер, вероятно, служит наиболее широко используемым буфером в биохимии вследствие его высокой буферной емкости, низкой токсичности, инертности в большинстве биохимических реакций, отсутствия взаимодействия с ионами металлов и доступности в очень чистом виде. Тем не менее следует иметь в виду три особенности: 1) он реагирует с некоторыми электродами, о чем уже говорилось; 2) значение pH трис-буфера зависит от температуры сильнее, чем для большинства других буферов, — pH увеличивается с понижением температуры приблизительно на 0,03 единицы на градус в интервале от 25 до 5°C; 3) концентрационная зависимость его также бóльшая, чем для многих других буферов, — относительное значение pH буфера с концентрациями 0,01, 0,05 и 0,1 M составляет x, $x+0{,}05$ и $x+0{,}1$ соответственно.

Типы электродов

Каталоги фирм — производителей электродов для pH-метров могут вызвать затруднения при выборе. Однако внимательное их изучение показывает, что в действительности существует лишь несколько разновидностей электродов.

Стеклянные («H^+-проницаемые») электроды бывают четырех типов: электроды общего назначения, высокотемпературные, с малой натриевой ошибкой (электроды «высоких pH») и сверхчувствительные к Na^+ (используемые для измерения концентрации Na^+).

Электроды сравнения («H^+-непроницаемые») делятся на три типа: общего назначения (обычно каломельные), высокотемпературные и ахлоридные, т. е. не содержащие хлорид-иона (вместо хлорида используется $Hg/HgSO_4$). Некоторые из них помещены в стеклянную трубку, на конце которой имеется отверстие, закрытое стеклянным фильтром; это позволяет быстро установить равновесный потенциал в образцах с высокой вязкостью, в эмульсиях или в растворах с осадком.

В биохимии применяется практически только комбинация стеклянного электрода с электродом сравнения в одной ячейке. Главное преимущество такой единой ячейки состоит в возможности проведения измерений в минимальном объеме. Недостатком

этой системы является высокая стоимость и полная негодность при поломке хотя бы одного элемента.

Кроме того, существуют электроды, позволяющие измерять не только pH, но и другие параметры. Например, металлические электроды могут использоваться для измерения окислительно-восстановительных потенциалов и концентраций специфических ионов. Для окислительно-восстановительных измерений обычно применяется платина, так как она устойчива к химическим воздействиям. Серебряные электроды используются для прямого потенциометрического определения Cl^-, Br^-, I^-, S^{2-} и SH^- (другими словами, тех ионов, серебряные соли которых имеют низкую растворимость). Эти измерения проводятся с помощью милливольтметра, составной части большинства производимых pH-метров. Например, для определения концентрации Cl^- измеряют растворы с различными концентрациями хлорид-иона и устанавливают при этом зависимость между показаниями милливольтметра и $[Cl^-]$. Концентрацию Cl^- в образце далее легко определить по калибровочному графику. Окислительно-восстановительные потенциалы измеряются сходным образом с использованием стандартных растворов с известными величинами окислительно-восстановительных потенциалов.

Для различных целей выпускаются электроды различных размеров и форм.

Использование индикаторной бумаги

Для определения pH существует большое число цветных индикаторных бумаг, причем некоторые типы обладают чувствительностью до 0,2 единицы pH. Иногда они бывают полезны для приближенных измерений, однако важно помнить, что присутствие в образце солей в высокой концентрации, белка и некоторых хроматографических материалов, таких, как ДЭАЭ-целлюлоза, способно вносить ошибку до нескольких единиц pH. В ряде случаев красители, которыми пропитана бумага, могут реагировать с органическими веществами в растворе, что приводит к изменению окраски, не обусловленному pH. Наконец, в слабо забуференных растворах красители бумаги могут действовать как буферы и изменять pH, давая при этом ошибочные показания.

Избранная литература

Bates R. G., Determination of pH: Theory and Practice, Wiley, 1964.

Dole M., The Glass Electrode, Wiley, 1941.

Кроме того, можно пользоваться брошюрами фирм Beckman, Corning и Radiometer.

ГЛАВА 5

Введение радиоактивных меток и измерение радиоактивности

При многих биохимических анализах обычно требуется определить ничтожные (10^{-14} — 10^{-6} моля) количества вещества. Химические же методы редко позволяют определять количества меньше 10^{-7} моля. Это ограничение было преодолено развитием техники радиоактивных меток и созданием чувствительных детекторов радиоактивности, позволяющих надежно определять многие вещества в количествах 10^{-12} моля. Кроме того, использование радиоактивных меток дало толчок для развития плодотворных экспериментальных подходов к решению разнообразных проблем. Такие подходы включают технику *двойной метки* для одновременного наблюдения за двумя соединениями или для распознавания двух идентичных веществ, синтезируемых в разное время; метод *импульсной метки,* позволяющий наблюдать за соединением после его образования без помех со стороны конкурентно синтезируемого вещества; *анализ процессов обмена* для определения участия в реакциях.

В данной главе будут описаны некоторые детали этих и других методов. Кроме того, здесь будут обсуждаться различные методы обнаружения и измерения радиоизотопов. Авторадиография будет рассмотрена в гл. 6, поскольку техника этого метода и его приложения существенно отличаются от предмета данной главы.

Типы ядерных распадов, используемые в биохимии

Ядерная радиация является результатом самопроизвольных превращений атомных ядер. Из нескольких типов ядерных распадов наибольшее значение для изотопного мечения имеют радиоизотопы, испускающие β-частицы (электроны) и γ-лучи (фотоны) *.

---

* Альфа-излучатели используются реже по двум причинам: 1) их определение сложно, так как α-частицы сильно поглощаются самим образцом, и 2) имеется лишь небольшое число α-излучающих изотопов, которые можно использовать в биологических материалах.

Бета-распад

Для конкретного β-излучающего ядра излучаемые β-частицы имеют непрерывный набор энергий от нуля до максимального значения ($E_{макс}$), строго определенного для данного изотопа. График зависимости относительной вероятности испускания β-частицы от энергии называется β-спектром. Спектры некоторых часто используемых радиоактивных изотопов приведены на рис. 5-1. Энергия данного β-излучения по традиции описывается значением $E_{макс}$ несмотря на то, что доля частиц с энергией, близкой $E_{макс}$, очень мала. Правильнее было бы использовать среднее значение энергии $E_{ср}$, поскольку большая доля частиц имеет энергию, близкую к этому значению. $E_{ср}$ приблизительно соответствует $^1/_3$ $E_{макс}$. Эти спектры важны для идентификации нескольких изотопов в одном образце и будут обсуждаться ниже в разделе, посвященном измерениям радиоактивности с использованием жидких сцинтилляторов.

При прохождении β-частиц через вещество их энергия рассеивается главным образом за счет ионизации и(или) возбуждения атомов, с которыми они взаимодействуют. Эти процессы регистрируют счетчиками Гейгера — Мюллера (ионизация) и сцинтилляционными счетчиками (возбуждение), которые подробно будут описаны ниже.

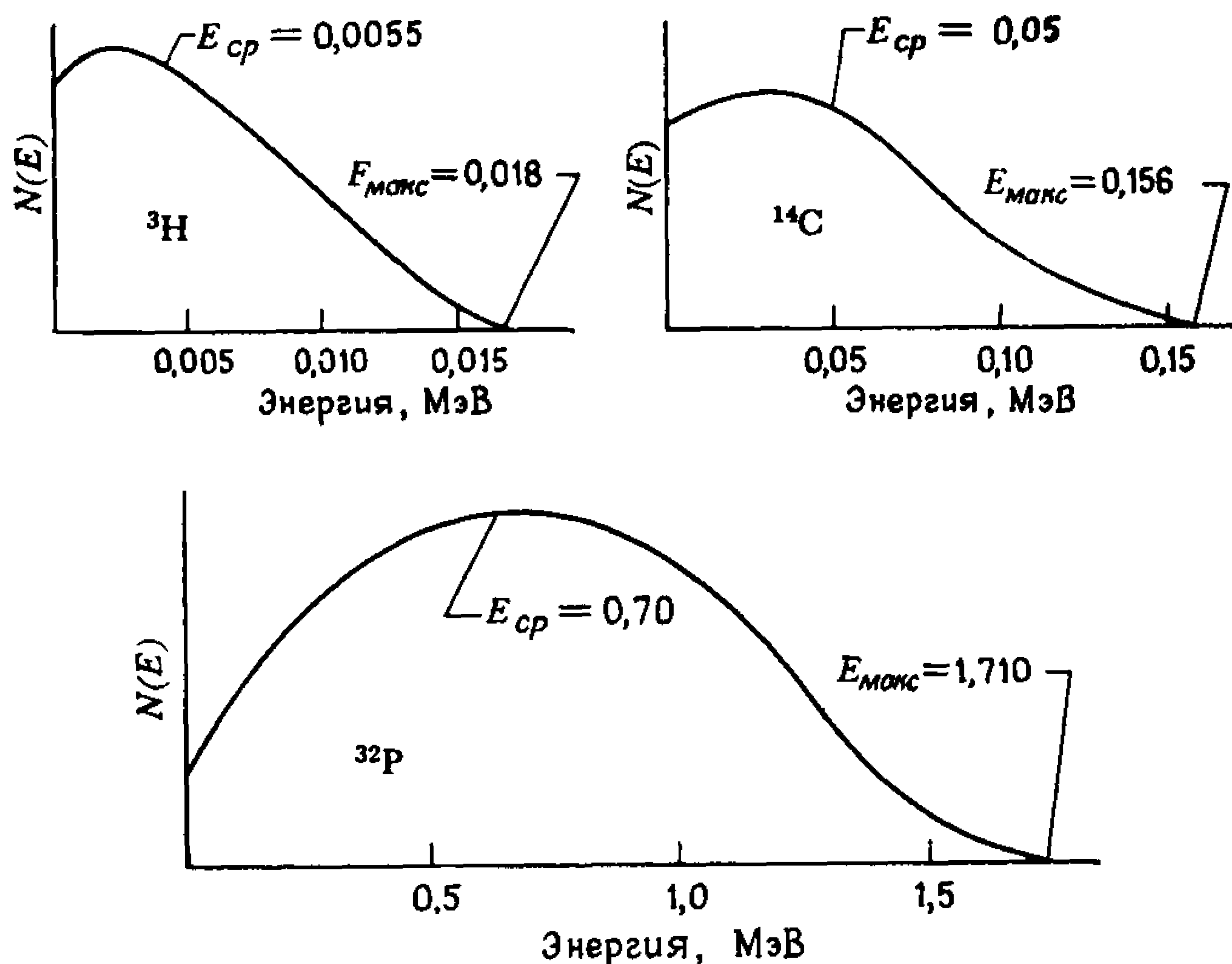


РИС. 5-1.

Бета-спектры для ^3H, ^{14}C и ^{32}P.

E — энергия частиц, $N(E)$ — число излучаемых частиц с энергией E. $N(E)$ служит мерой вероятности эмиссии частицы с данной энергией.

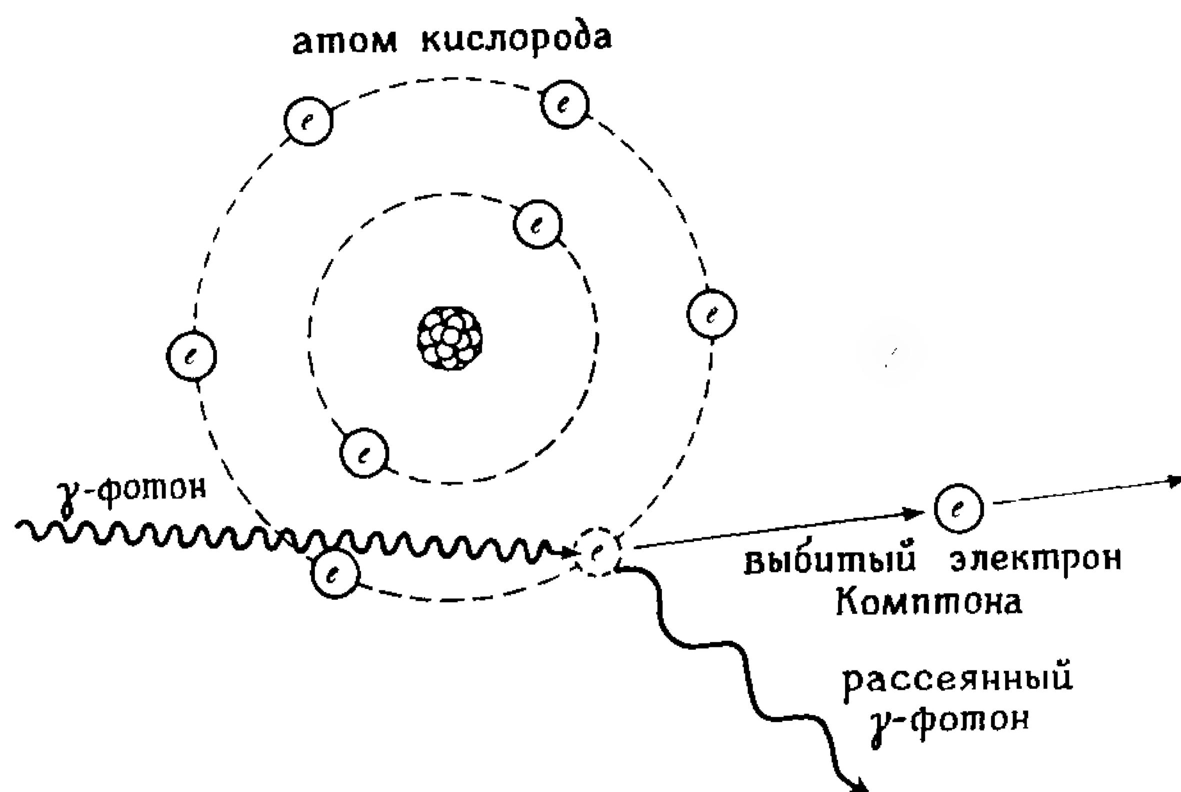


РИС. 5-2.

Выбивание электрона при взаимодействии γ-фотона и атома кислорода.

Распад с испусканием γ-лучей

Гамма-лучи представляют собой электромагнитное излучение, испускаемое данным радиоизотопом. Они имеют одно или несколько дискретных значений энергии в отличие от непрерывного энергетического β-спектра у β-излучающих изотопов. γ-Лучи не несут заряда и, следовательно, не могут прямо ионизировать атомы на своем пути. Однако они могут взаимодействовать с орбитальными электронами, выбивая их с орбитали, или с электромагнитным полем ядра, давая пару электрон — позитрон (рис. 5-2). В обоих типах взаимодействия вторичные электроны, образующиеся под действием γ-фотонов, подобны β-частицам и также способны ионизировать и возбуждать другие атомы. Учитывая это, методы обнаружения γ-лучей в конечном итоге те же, что и для β-частиц. На практике, как это будет видно из последующих разделов, вследствие низкой вероятности взаимодействия с веществом (часто говорят о высокой проникающей способности γ-лучей), для измерения γ-радиоактивности необходимы специальные детекторы.

Свойства радиоактивного распада химических соединений

В любой момент времени число атомов радиоактивного материала, распадающихся за единицу времени, пропорционально общему числу имеющихся атомов. Таким образом, если N — число

атомов, присутствующих во время t, и dN — число атомов, распадающихся за отрезок времени dt, то

$$-\frac{dN}{dt} = \lambda N, \qquad (1)$$

где λ — постоянная распада. Отсюда, если N_0 — число атомов при $t=0$, то

$$N = N_0 e^{-\lambda t}. \qquad (2)$$

Экспоненциальное уравнение распада указывает на то, что в течение любого данного интервала времени радиоактивность (скорость распада) препарата будет уменьшаться с одинаковой скоростью. Удобно выразить постоянную распада через период полураспада $\tau_{1/2}$, т. е. через время, за которое радиоактивность (скорость распада) уменьшается наполовину. Следовательно, $\tau_{1/2} = (\ln 2)/\lambda = 0{,}693/\lambda$. Легко видеть, что через время, равное периоду полураспада, остается половина первоначальной радиоактивности, после двух периодов полураспада — одна четверть и т. д. Периоды полураспада некоторых изотопов обычно используемых в биологических исследованиях, даны в табл. 5-1. (Обратите внимание на огромный диапазон периодов полураспада.)

ТАБЛИЦА 5-1

Характеристики обычно используемых изотопов

Изотоп	Испускаемая частица	$E_{макс}$, МэВ	Период полураспада
^{3}H	β	0,018	12,3 года
^{14}C	β	0,155	5568 года
^{24}Na	β	1,39	14,97 ч
	γ	1,7; 2,75	
^{32}P	β	1,71	14,2 дня
^{35}S	β	0,167	87 дней
^{40}K	β	1,33; 1,46	$1{,}25 \cdot 10^{9}$ лет
^{45}Ca	β	0,254	164 дня
^{131}I	β	0,335; 0,608	8,1 дня
	γ	0,284; 0,364; 0,637	

Важнейшая причина, по которой необходимо знать период полураспада изотопа, используемого в эксперименте, заключается в том, что в случае, когда период полураспада сравним с временем, требуемым для проведения эксперимента, количество определяемого вещества будет зависеть от момента времени, в который проводится измерение. Следовательно, если радиоактивность

предполагается использовать для определения количества вещества, присутствующего в данный момент времени, то необходимо вносить поправку на изменение скорости распада. Период полураспада определяет также максимально доступную удельную радиоактивность (см. ниже) и позволяет подобрать наиболее удобный изотоп для конкретного эксперимента.

Радиоактивность выражается в единицах *кюри*. Один кюри (Ки) определяется как число распадов в секунду в 1 г радия и эквивалентен $3{,}70 \cdot 10^{10}$ расп/с. Для большинства биологических задач обычно используют гораздо меньшую радиоактивность, употребляя милликюри (мКи) или микрокюри (мкКи). Более того, на практике в качестве стандартной единицы времени используют минуту, поэтому 1 мкКи$=2{,}22 \cdot 10^{6}$ расп/мин. По причинам, которые будут рассмотрены ниже, крайне трудно определить абсолютное число распадов, поскольку счетчики радиоактивности регистрируют только часть их. Поэтому радиоактивность обычно выражают в единицах регистрируемых импульсов в минуту. Для высокоточных количественных экспериментов, в которых радиоактивность используется для определения абсолютного количества материала, радиоактивность выражают в распадах в минуту путем деления на эффективность измерения.

Радиоизотопы и соединения, меченные изотопами, редко бывают изотопно чистыми — радиоизотопы обычно разбавлены химически идентичными нерадиоактивными изотопами. (Некоторые изотопы, например ^{32}P, могут быть получены в чистом виде, но они редко используются как таковые.) Относительное содержание радиоизотопов описывается *удельной радиоактивностью*— скоростью распада на единицу массы. Обычно она выражается как радиоактивность (Ки, мКи или мкКи) на 1 ммоль или 1 мкмоль. К сожалению, удельная радиоактивность может быть выражена различным образом: например, удельная радиоактивность ^{14}C-глицина, который содержит два атома углерода, может быть принята равной как 50 мкКи/мкмоль, так и 25 мкКи/мкмоль атомов углерода. Отсюда следует, что важно обращать внимание на единицы удельной радиоактивности.

Часто возникают трудности при определении и учете *радиохимической чистоты* меченых соединений. Например, когда синтезируется меченный изотопами биологический материал, реакционная смесь содержит разнообразные меченые продукты, которые затем разделяются для получения радиохимически чистых веществ. Производители радиоактивных препаратов обычно прилагают к ним данные анализа, указывая тем самым степень чистоты. Однако радиохимическая чистота может изменяться во времени по двум причинам. Во-первых, радиация, излучаемая одной молекулой, может изменять идентично меченную молекулу либо непосредственно вследствие ионизации с последующей хи-

мической перегруппировкой, либо непрямым путем через ионизацию растворителя (радиолиз) с образованием реакционноспособных продуктов, которые далее способны модифицировать первоначально чистое вещество. Это особенно опасно при хранении радиоактивных препаратов в водных растворах. Во-вторых, если вещество содержит два атома, меченных изотопами (что в общем необычно, за исключением так называемых равномерно меченных соединений), распад одного из них с образованием нового атома будет приводить к молекулярной перегруппировке. Рассмотрим, например, вещество с двумя ^{3}H-атомами в каждой молекуле. β-Распад одного ^{3}H-ядра превращает водород в гелий. Поскольку гелий не может участвовать в образовании химической связи, должна происходить молекулярная перегруппировка с образованием в итоге нового радиоактивного вещества, содержащего второй ^{3}H-атом. Сходным образом при распаде ^{14}C образуется ^{14}N, и, так как валентности углерода и азота различаются, должна иметь место химическая перегруппировка. Бо́льшая часть этих осложнений может быть сведена к минимуму, если следовать указаниям по хранению, использовать свежеприготовленные вещества и при необходимости очищать вещества перед употреблением с помощью хроматографии или электрофореза.

Измерение β-активности методами, основанными на ионизации газов

β-Частица, проходя через газ, способна выбивать орбитальный электрон одного из атомов газа, в результате чего образуется ионная пара — выбитый электрон плюс остающийся положительно заряженный ион. При этом β-частица может иметь значительную энергию, достаточную для ионизации нескольких атомов. Если газ находится в камере, снабженной двумя заряженными электродами, то вторичные электроны и положительные ионы будут двигаться к аноду и катоду соответственно, что можно зарегистрировать в виде очень маленького импульса заряда или тока. β-Частица со средней энергией будет давать от 10^2 до 10^3 пар ионов на 1 см пробега, однако не все эти ионы достигают электродов, поскольку ионные пары быстро рекомбинируют. Эффективность регистрации ионов зависит от напряжения между электродами. Например, при очень низком напряжении большинство ионов рекомбинируют до того, как они достигнут электродов, однако при увеличении напряжения захватывается уже бо́льшая фракция ионов до их рекомбинации. Наконец, напряжение возрастает настолько, что все ионы достигают электродов,

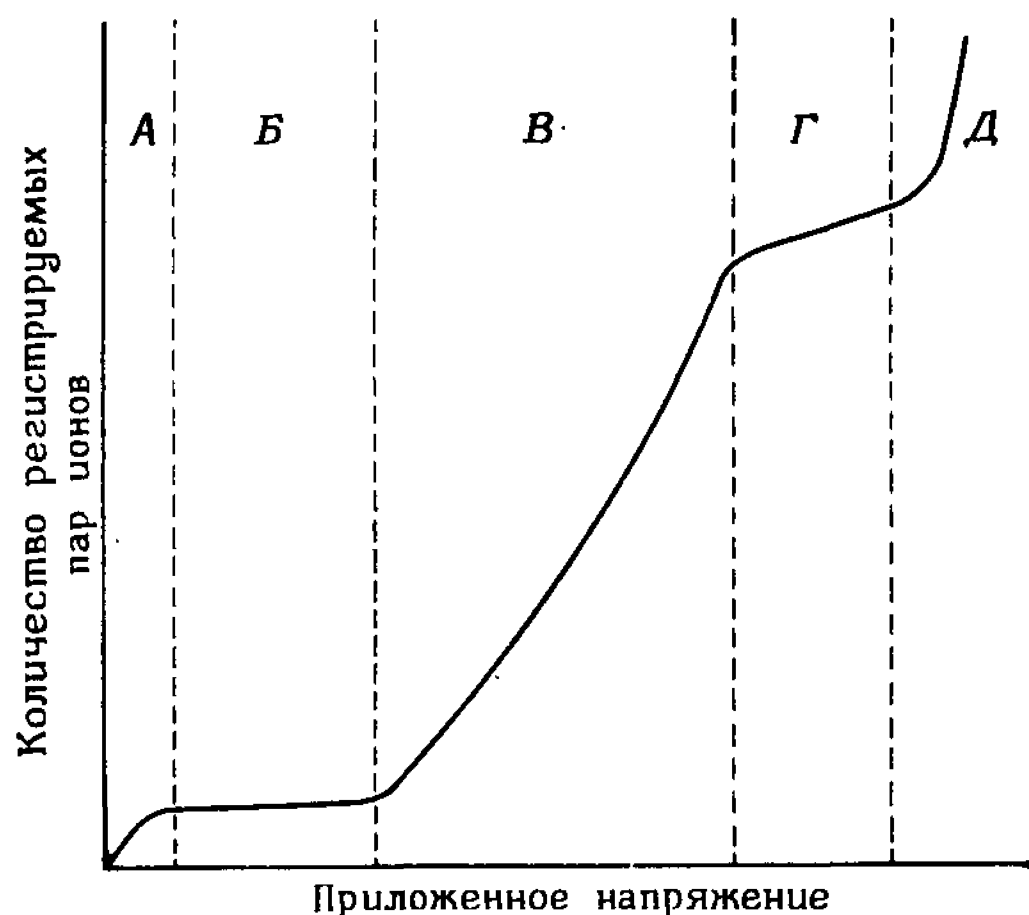


РИС. 5-3.

Выход (количество пар ионов) в трубке Гейгера — Мюллера как функция напряжения между анодом и катодом.

А — область рекомбинации; *Б* — область простой ионизации; *В* — область пропорциональности; *Г* — область Гейгера—Мюллера; *Д* — область постоянного разряда.

что приводит к *насыщению*. Это свойство ионизационных камер показано на рис. 5-3. При гораздо большем напряжении (значительно более высоком, чем требуется для насыщения), выбитые орбитальные электроны ускоряются настолько, что это вызывает ионизацию атомов газа. Этот процесс называется *ионной лавиной* или *газовым усилением*. При еще более высоком напряжении количество собираемых вторичных ионов становится пропорциональным их количеству, образованному при первоначальной ионизации (область пропорциональности). Далее следует вторая область насыщения (область Гейгера — Мюллера), где все возможные ионные пары, как первичные, так и вторичные, собираются электродами полностью; наконец, при достижении достаточно высокого напряжения газ ионизуется под действием приложенного напряжения даже без участия β-частиц (область постоянного разряда). Полностью зависимость системы от напряжения показана на рис. 5-3.

Ионизационные детекторы могут работать либо в области пропорциональности, либо в области Гейгера — Мюллера. Пропорциональный счет имеет то преимущество, что частицы с неодинаковыми энергиями могут различаться при использовании анализаторов интенсивности импульсов (см. разд. «Пропорциональный счет и анализ амплитуды импульсов»), поскольку величина импульса тока, снимаемого с электродов, пропорциональна энергии исходной заряженной частицы, которая попадает в камеру. Таким образом, два различных радиоактивных изотопа, присутствующих в одном образце, и их относительное содержание могут быть определены по их β-спектрам с использованием методики, описанной в примере 5-А применительно к жидкостным сцинтилляционным счетчикам. Неудобство пропорциональ-

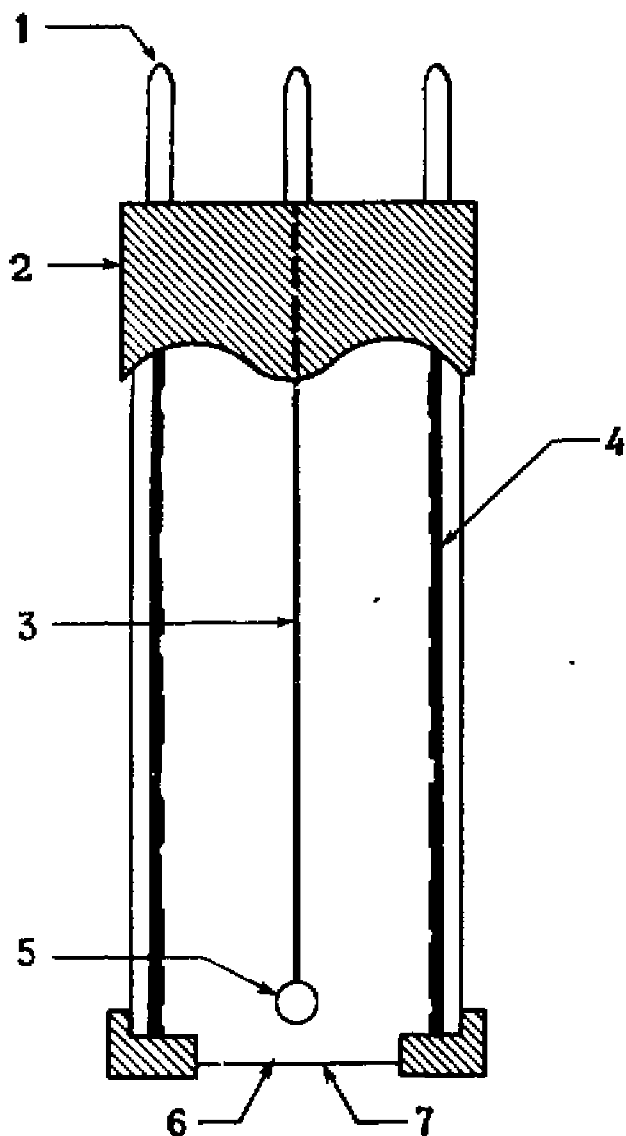


Рис. 5-4.

Торцовый счетчик Гейгера — Мюллера.

1 — контакт катода; 2 — изолированная основа; 3 — анодная нить; 4 — металлизированная поверхность-катод; 5 — стеклянный шарик; 6 — вход частиц, 7 — окошко из слюды.

ного счета состоит в необходимости иметь исключительно стабильный высоковольтный источник питания, поскольку малейшие флуктуации напряжения могут приводить к большим изменениям тока. Пропорциональное определение обычно заменяется использованием жидкостных сцинтилляционных счетчиков (см. следующий раздел) и далее обсуждаться не будет.

В области Гейгера — Мюллера достигается максимальное газовое усиление, и флуктуации напряжения практически не оказывают влияния на ток. Это используется в относительно недорогих, но надежных, чувствительных и стабильных приборах — счетчиках Гейгера — Мюллера.

Схема наиболее распространенного типа счетчика Гейгера — Мюллера — так называемого *торцового счетчика* — представлена на рис. 5-4. Детектор представляет собой цилиндр, внутренняя стенка которого покрыта металлом и служит катодом, по оси проходит проволочный анод, а в торце расположено окно, через которое β-частицы попадают в заполненную газом камеру (окно обычно делается из слюды или пленки полимера под названием «майлар»). Электронная система измеряет ток, возникающий при захвате электронов анодом. Трубка обычно заполнена инертным газом, таким, как гелий, неон или аргон, к которому прибавляют небольшое количество *гасящего агента* — обычно бутана, пропана, этанола, хлора или брома. Гасящий агент служит для предотвращения постоянной ионизации, которая может приводить к тому, что детектор не может реагировать на любую последую-

щую частицу, попавшую в него после первой. Когда положительный ион находится вблизи катода, он иногда может оторвать от него электрон и вновь образовать нейтральный атом. Такая рекомбинация приводит к рентгеновскому и коротковолновому ультрафиолетовому излучениям, каждое из которых способно ионизировать молекулы газа с образованием последующей лавины электронов. Таким образом, возникает самопроизвольная постоянная ионизация. Однако в присутствии гасящего газа (например, бутана), имеющего более низкий потенциал ионизации, чем основной газ (например, гелий), положительные ионы гелия будут взаимодействовать с бутаном, приобретая его электрон, с образованием нейтрального атома гелия и положительно заряженного иона бутана. Эти ионы движутся к катоду и получают электрон, становясь при этом снова нейтральными, однако вследствие физических и химических особенностей бутана избыток энергии рекомбинации не превращается в электромагнитное излучение, а вместо этого приводит к разрыву химических связей в молекуле бутана, вызывая ее распад. После определенного числа разрядов гасящий газ полностью расходуется. Реально большинство коммерческих трубок Гейгера — Мюллера способно регистрировать от 10^8 до 10^{10} импульсов прежде, чем детектор придет в негодность. Это ограничение может быть устранено, если снабдить трубки отверстиями для входа и выхода и пропускать через трубку непрерывный поток газа. Такой прибор называется *проточным счетчиком*. Чувствительность трубки может быть повышена, если она не имеет окна, так как многие β-частицы либо не могут проникнуть через окно, либо, проходя через него, теряют столько энергии, что уже не могут ионизировать газ. В этом случае трубка изготовляется таким образом, чтобы был обеспечен близкий контакт с держателем образца. Поскольку при введении или удалении образца газ теряется, трубку постоянно продувают током газа. Такая модификация известна под названием *проточного счетчика без окна*.

Измерение радиоактивности жидкостными сцинтилляционными счетчиками

Идеальный прибор для измерения радиоактивности должен регистрировать все распады, но такого прибора не существует. Счетчики Гейгера — Мюллера без окна служат весьма эффективными детекторами β-частиц с высокой энергией, излучаемых, например ^{32}P, но плохо подходят для частиц с низкой энергией, например из ^{3}H. Эффективность ограничивается двумя основными фак-

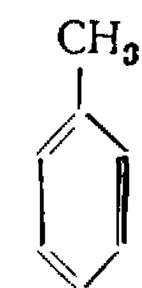
торами: во-первых, не все испускаемые частицы попадают в детектор, и, во-вторых, не все из попавших туда частиц регистрируются. Главной причиной того, почему не все частицы достигают детектора, является его геометрия, которая такова, что некоторые частицы излучаются в сторону от детектора. Например, даже в том случае, если образец прижат к передней плоскости детектора Гейгера — Мюллера, половина частиц будет излучаться в направлении, противоположном трубке. Существенным также является то, что не все частицы, попавшие внутрь трубки Гейгера — Мюллера, могут вызывать ионизацию газа. Из β-спектров на рис. 5-1 видно, что энергия частицы может варьировать до нуля ($E_{мин}$ не существует), т. е. некоторая доля частиц заведомо имеет энергию меньшую, чем требуется для ионизации газа. Кроме того, из формы спектра следует, что с уменьшением $E_{ср}$ постоянно увеличивается доля частиц с очень низким уровнем энергии. Таким образом, главной проблемой для всех счетчиков является регистрация β-частиц с низкой энергией.

Геометрические трудности могут быть устранены, если образец поместить *внутри* детектора. При этом будут теряться только

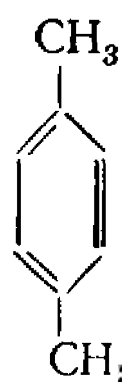
ТАБЛИЦА 5-2

Растворители и флуоресцирующие вещества, обычно применяемые при измерении радиоактивности жидкостным сцинтилляционным методом

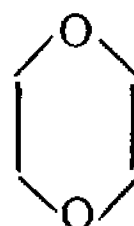
Растворители



толуол



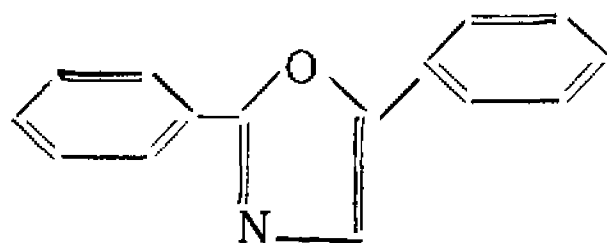
п-ксилол



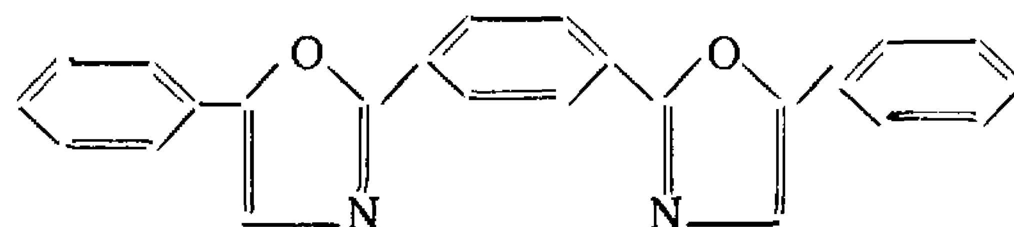
1,4-диоксан

Флуоресцирующие вещества

PPO



POPOP



те частицы, которые неспособны выйти за пределы образца («самопоглощение»). Такое решение геометрических проблем достигается применением техники *измерения радиоактивности жидкостным сцинтилляционным методом.*

При жидкостном сцинтилляционном счете образец растворяют или суспендируют в растворителе, содержащем одно или более флуоресцирующих веществ (табл. 5-2). Коротко говоря, испускаемая частица вызывает вспышку света, которую обнаруживают оптическим прибором (фотоумножителем), превращающим ее в электрические импульсы, которые могут быть просчитаны.

Процесс сцинтилляции

Прежде всего необходимо понять, каким образом распад вызывает обнаруживаемую флуоресценцию. Рассмотрим β-частицу, которая вышла за пределы образца и попала в растворитель. В большинстве растворителей энергия частицы либо будет рассеиваться в виде тепла, либо будет вызывать химические изменения (например, ионизацию или диссоциацию). Однако в некоторых растворителях энергия поглощается молекулами растворителя таким образом, что они переходят в возбужденное состояние. Возбужденная молекула затем возвращается в основное состояние, отдавая энергию в виде светового фотона (подробно процесс флуоресценции обсуждается в гл. 15). Излучаемые при этом фотоны имеют очень короткую длину волны и поэтому не могут регистрироваться большинством фотодетекторов; необходима добавка очень малых количеств флуоресцирующего вещества *(флуоресцента)*, способного эффективно поглощать фотоны, излучаемые возбужденными молекулами растворителя, и в свою очередь испускать фотоны с большей длиной волны. Фотоны, испускаемые флуоресцентом, должны регистрироваться фотоумножителем. Однако, если длины волн фотонов, излучаемых флуоресцентом, не лежат в диапазоне максимальной чувствительности фотоумножителя, не будут генерироваться достаточно большие электрические импульсы. Поэтому почти всегда добавляют второй флуоресцент. Этот флуоресцент поглощает фотоны, испускаемые первоначально добавленным флуоресцентом, и вновь испускает фотоны, но с большей длиной волны, которые фотоумножитель регистрирует хорошо. Следует заметить, что ни первичный, ни вторичный флуоресцент фактически не поглощают первоначальную энергию β-частиц (поскольку они присутствуют в относительно малых количествах), а работают как преобразователи фотонов, увеличивая длину волн света.

Эта последовательность взаимодействий превращает энергию излучаемой частицы в световую вспышку, т. е. в пучок фотонов, выделяемый за предельно короткий интервал времени ($\sim 10^{-9}$ с).

Заметим, что свет не обязательно выходит из одной точки вследствие многократного переноса энергии. Эффективность регистрации первоначального распада зависит от следующих факторов: 1) свойств растворителя (т. е. от доли поглощенной энергии, пошедшей на возбуждение, и от ее доли, перенесенной на первичный флуоресцент, а не рассеянной в виде тепла); 2) числа фотонов, испускаемых первичным и вторичным флуоресцентами; 3) геометрии трубки фотоумножителя (т. е. от того, какова эффективность улавливания фотонов); 4) соотношения сигнал/шум фотоумножителя (под шумом подразумевают импульсы, генерируемые в отсутствие света); 5) цикла преобразования заряда на фотоумножителе в напряжение.

Фоновый шум

Шум является серьезной проблемой при создании жидкостных сцинтилляционных счетчиков, значение которой легко понять, если рассмотреть диапазон электрических импульсов, возникающих при единичном β-распаде. Предположим, что β-частица с энергией 50 КэВ (например, из ^{14}C) будет давать несколько сот фотонов в обычно используемой системе растворитель — флуоресцент. Эти фотоны приведут к образованию приблизительно 50 фотоэлектронов (10—20%) на фотокатоде фотоумножителя. При усилении примерно в 10^6 раз фотоумножитель даст $5 \cdot 10^7$ электронов или заряд в пределах от $0{,}5 \cdot 10^{-11}$ до $1{,}0 \cdot 10^{-11}$ Кл, который может быть преобразован в электрический импульс от 0,1 до 0,2 В. Для ^3H $E_{ср}$ составляет 5,5 КэВ, чему соответствует импульс приблизительно 0,018 В.

Низкое напряжение подобных импульсов порождает проблему, связанную с тем, что тепловой шум фотоумножителя приводит к появлению импульсов порядка 0,005 В уже при комнатной температуре. Следовательно, значительная доля излучаемых β-частиц (эта доля увеличивается с уменьшением $E_{макс}$) дает импульсы с напряжением меньшим, чем термоионный шум.

Эта проблема решалась двумя путями. Первый состоял в помещении фотоумножителя и образцов в термостат с температурой от 0 до 5°С, что понижало уровень шума примерно в 4 раза; сейчас, с появлением фотоумножителей с низким уровнем шума, стало возможным работать при комнатной температуре. Термоионный шум дает в результате единичный импульс, тогда как β-частицы обычно вызывают образование нескольких фотонов. Отсюда второй путь решения проблемы — использование двух фотоумножителей; выходы фотоумножителей вводятся в *электрическую схему совпадений,* которая регистрирует отсчет только в том случае, когда две величины регистрируются фотоумножителями *одновременно* (т. е. в пределах короткого временного ин-

тервала). При этом единичные импульсы отсеиваются. Работа схемы совпадений такова, что лишь в редчайших случаях возможно столь быстрое следование одного шумового импульса за другим, чтобы оно было зарегистрировано. Импульс регистрируется практически только тогда, когда два фотона возникают в результате действия *одной* β-частицы. Схема совпадений понижает уровень шумовых отсчетов с 10^5 до 15 имп/мин (это и есть число импульсов, проходящих через схему совпадений).

Необходимость использования схемы совпадений делает невозможным определение β-частиц с низкой энергией со 100%-ной эффективностью, поскольку для этого требуется минимум два фотона (по одному на каждый фотоумножитель), тогда как некоторое число распадов приводит к образованию только одного фотона. Однако этот недостаток более чем компенсируется огромным выигрышем, получаемым за счет резкого снижения фона.

Существуют и другие источники фоновых импульсов, хотя они и менее значимы. На них чаще наталкиваются те, кто непосредственно работает со счетчиками. Так, одним из таких источников является радиоизотоп ^{40}K из стекла. Поэтому, если образец представляет собой раствор, контейнер для него должен быть изготовлен из стекла с низким содержанием калия. Это существенно, поскольку в обычном стекле присутствует большое количество радиоизотопа ^{40}K. Однако даже в стекле с низким содержанием калия имеется некоторое количество ^{40}K, который может дать фон приблизительно на уровне 15 имп/мин, т. е. величину, аналогичную термоионному шуму. Для некоторых операций, требующих очень низкого значения фона, с целью исключения фона за счет ^{40}K используют сосуды из полиэтилена, однако они устойчивы не во всех растворителях, используемых при сцинтилляционном счете, и поэтому их можно применять не во всех случаях. Другим источником фона является генерация светового излучения за счет эффекта Черенкова с длинами в области эффективной работы фотоумножителей. Излучение Черенкова возникает в результате взаимодействия сцинтилляционного растворителя (без участия флуоресцента) и собственно сосуда с космическими лучами. В результате этого процесса регистрируются импульсы в диапазоне низко- и среднеэнергетических β-частиц, что добавляет к фону еще до 10 имп/мин. Имеются и другие источники внешней радиоактивности. Если сосуд с образцом содержит растворитель и флуоресцент, то внешняя радиоактивность вносит дополнительный шум на уровне около 40 имп/мин. Наложение этих эффектов, включая термоионный шум, дает фон приблизительно в пределах от 80 до 90 имп/мин. Однако из-за того, что излучаемые β-частицы имеют определенную максимальную энергию, можно отсеять импульсы с энергией, превышающей это значение. Это осуществляют методом анализа амплитуды им-

пульсов с использованием дискриминаторов (см. ниже). В результате фон понижается примерно до 35 имп/мин без потери эффективности счета.

Тушение

Возможность зарегистрировать радиоактивность зависит от соотношения сигнал/шум. До сих пор обсуждались возможности улучшения этого соотношения только за счет понижения шума. Далее мы рассмотрим проблемы, связанные с *максимальным увеличением эффективности образования фотонов* (иными словами, максимализацией сигнала).

Тушение соответствует понижению эффективности переноса энергии от β-частиц на фотоумножитель (любым способом). Тушение приводит к уменьшению (возможно, до нуля) числа фототонов на β-частицу и вследствие этого к импульсу с пониженным напряжением. Различают тушение *химическое, цветовое* и *за счет разбавления.*

Химическое тушение

При введении образца в сцинтилляционный раствор следует иметь в виду, что образец сам может содержать вещества, способные либо поглощать часть энергии β-частиц без выделения фотона, либо поглощать фотоны, испускаемые возбужденными молекулами, без флуоресценции. Наиболее распространенными агентами, вызывающими химическое тушение, являются вода, кислоты, соли и растворенный кислород.

Цветовое тушение

Окрашенные образцы могут поглощать часть фотонов, испускаемых вторичным флуоресцентом. Существенно то, что отсутствие видимой окраски образца еще не является критерием отсутствия цветового тушения, поскольку глаз человека не в состоянии определить, может ли данное вещество поглощать в ближней ультрафиолетовой области. При этом в силе остается вероятность некоторого цветового тушения при наличии желтой, красной или коричневой окраски образца.

Тушение за счет разбавления

Разбавление растворителя и флуоресцента образцом уменьшает вероятность сцинтилляции. Если образец представляет собой жидкость, этого избежать нельзя, однако при анализе может быть введена поправка. Этот прием будет описан ниже.

Пропорциональный счет и анализ амплитуды импульсов

Самым большим преимуществом сцинтилляционных счетчиков является возможность определить соотношение двух радиоизотопов, находящихся в смеси. Это следует из того, что импульс напряжения, получаемый в результате распада, пропорционален энергии излучаемых частиц. Различить два радиоизотопа можно с применением *анализатора амплитуды импульсов*, оснащенного *дискриминаторами*. Анализатор амплитуды импульсов представляет собой электронное устройство, способное различать флуктуации (импульсы) тока или напряжения. При регистрации импульса измеряется и его амплитуда. Такой прибор включается в цепь, рассчитанную на счет импульсов в различных *интервалах* напряжения. Например, она может быть настроена таким образом, что будут фиксироваться импульсы от нуля или от какой-то другой величины, но меньше некоторого значения, или между какими-либо двумя значениями. Устройство, позволяющее определять уровни напряжения, между которыми должно осуществляться измерение, называется *дискриминатором*. Обычно для определения интервала напряжения используют два дискриминатора, что исключает шум от фотоумножителя с низкой энергией и внешний шум с высокой энергией. Применение более двух дискриминаторов позволяет одновременно считать в двух интервалах. Счет в двух диапазонах одновременно требует двух цепей счета. Каждая такая цепь осуществляет счет в *канале*, определяемом конкретными значениями напряжения, часто обозначаемыми L1, L2, L3 и т. д. Можно построить график зависимости скорости распада от энергии или амплитуды импульса с помощью подсчета импульсов в различных диапазонах напряжения. На

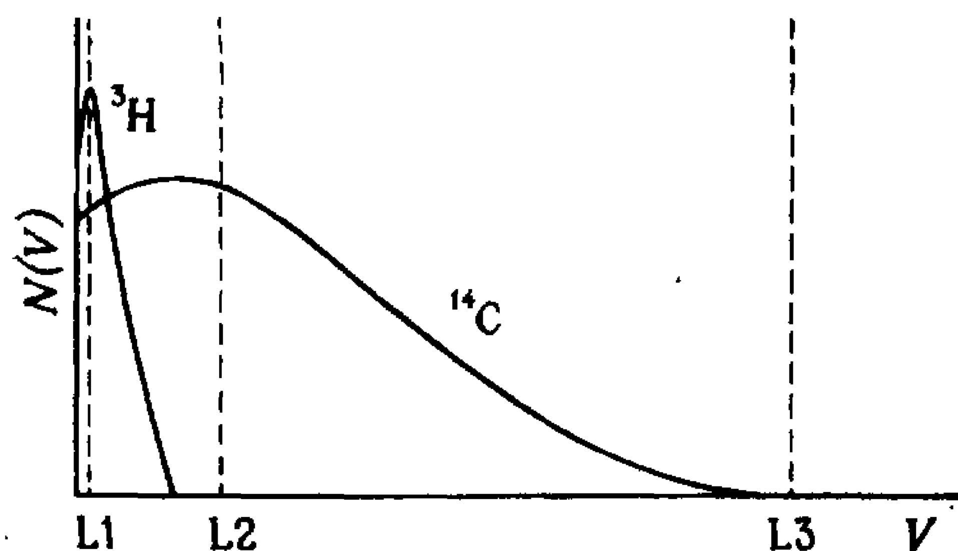


РИС. 5-5.

Одновременный счет ^3H и ^{14}C.

Спектры ^3H и ^{14}C изображены в единой шкале: L1 служит самым низким пределом для большинства счетчиков, ниже которого становится заметным тепловой шум; L2 и L3 — уровни напряжения, использованные в примере 5-А. Ось *y* имеет произвольную шкалу, дающую скорость счета в небольшом интервале, находящемся в пределах определенного напряжения.

рис. 5-5 показана такая зависимость для ^3H и ^{14}C. Поскольку таким образом можно определить скорость распада в данном интервале амплитуд импульсов, становится доступным и установление соотношения двух изотопов. Принцип такого определения иллюстрирует следующий пример.

Пример 5-А. *Соотношение радиоактивностей* ^3H *и* ^{14}C *в одном образце.* Рассмотрим радиоактивный образец, содержащий метки ^3H и ^{14}C, счет которых ведется в двух диапазонах напряжения, определяемых L1, L2 и L3, как показано на рис. 5-5. Полученные при этом данные представлены в табл. 5-3. При счете стандартных образцов, содержащих ^3H и ^{14}C, с использованием того же счетчика рассчитываются количества ^3H и ^{14}C в каждом канале (табл. 5-3).

ТАБЛИЦА 5-3

Вычисление соотношения $^3H/^{14}C$ в образце, содержащем двойную метку, в двух каналах сцинтилляционного счетчика

Образец	L1—L2 (канал А), имп/мин	L2—L3 (канал Б), имп/мин	Б/А	А/Б
Экспериментальный	500	800		
^3H-Стандарт	16 840	25	0,0015	—
^{14}C-Стандарт	4 250	10 200	—	0,416

Расчеты для образца

1. ^3H (имп/мин) в канале Б = 0,0015·500 = 0,75.
2. ^{14}C (имп/мин) в канале Б = 800—0,75 ≈ 800.
3. ^{14}C (имп/мин) в канале А = 0,416·800 = 333.
4. ^3H (имп/мин) в канале А = 500—333 = 167.
5. Всего ^3H (имп/мин) = 167.
6. Всего ^{14}C (имп/мин) = 333+800 = 1133.
7. $^3H/^{14}C$ = 167/1133 = 0,147.

Распределение радиоактивности стандартных ^3H- и ^{14}C-образцов в каналах А и Б позволяет определить, как распределены радиоактивности ^3H и ^{14}C в экспериментальном образце. Строка 1 показывает, что только 0,0015 всей радиоактивности ^3H попадает в канал Б, т. е. радиоактивность ^3H в этом канале практически равна нулю. Следовательно, вся радиоактивность в канале Б отвечает ^{14}C, что видно из строки 2. Данные по стандартному образцу ^{14}C свидетельствуют о том, что радиоактивность в канале А составляет 0,416 от радиоактивности этого стандарта в канале Б. Поскольку строка 2 указывает, что канал Б содержит радиоактивность только ^{14}C, можно провести расчет в строке 3. Отсюда следует, что из 500 имп/мин в канале А 333 при-

ходится на долю ^{14}C, а остальное число обусловлено ^{3}H, как показано в строке 4. Поскольку в канале Б фактически нет ^{3}H, все количество этого изотопа находится в канале А, что дается в строке 5. Общее количество ^{14}C определяется суммой ^{14}C в каналах А и Б — строка 6. Соотношение ^{3}H и ^{14}C можно подсчитать в строке 7. Заметим, что простота расчета становится возможной при таком выборе L2, чтобы импульсы ^{3}H не попадали в канал Б. Следует также помнить, что при большом избытке ^{14}C определение ^{3}H становится неточным. Предположим, например, что ^{14}C содержится в 20 раз больше, чем ^{3}H. В этом случае ^{14}C в канале А будет $20 \cdot 333 = 6660$ и общая радиоактивность, регистрируемая в канале А, составит $6660 + 167 = 6827$ имп/мин. Значение ^{3}H будет получено при вычитании 6660 из 6827.

Чтобы понять, в чем заключается трудность при вычитании больших чисел, рассмотрим статистику счета. В соответствии с теорией статистики стандартная ошибка измерения равна $N^{1/2}$, где N — общее число импульсов (не имп/мин). Отсюда следует, что существует вероятность, равная 68%, что «истинное» значение лежит в пределах $N \pm N^{1/2}$. Если образец из примера с $20 \cdot {}^{14}C$ считать одну минуту, ^{3}H будет получаться из разности между 6827 ± 82 и 6660 ± 81, т. е. в пределах от 4 до 330 имп/мин. Ясно, что ошибка огромна. Если же такой образец считать 10 мин, разность составит (68270 ± 261) — (66600 ± 259) и значение радиоактивности ^{3}H в этом случае может колебаться в пределах от 115 до 219 имп/мин; это уже лучше, но ошибка еще велика. При соотношении $^{3}H/^{14}C$, данном в примере, при счете в течение 10 мин радиоактивность ^{3}H будет составлять от 164 до 180 имп/мин.

Чтобы показать ценность техники двойной метки, дополним условия примера. Предположим, что ^{3}H включен в остаток лейцина с удельной радиоактивностью 5 Ки/ммоль, а ^{14}C — в остаток тирозина с удельной радиоактивностью 4 Ки/ммоль. Примем, что эффективность счета для ^{3}H и ^{14}C составляет 30 и 90% соответственно. Отсюда действительные значения радиоактивности для ^{3}H и ^{14}C (измеренная радиоактивность/эффективность счета) составят 167/0,30 и 1133/0,90, т. е. 556 и 1259 имп/мин соответственно. Следовательно, так как количества лейцина и тирозина определяются по соотношению (количество метки)/(удельная радиоактивность), молярное соотношение лейцина и тирозина составляет $(^{3}H/^{14}C)$ · (удельная радиоактивность тирозина/удельная радиоактивность лейцина) = (556/1259) · (4/6) = 0,353.

В примере 5-А принимается, что распределение радиоактивности между каналами А и Б для ^{3}H в экспериментальном и стандартном образцах одинаковое, причем это справедливо и для ^{14}C. При этом подразумевается, что тушение либо отсутствует, либо имеет одно и то же значение как для эксперименталь-

ного, так и для стандартного образцов. Если же это не соблюдается, возникает небходимость определения относительных степеней тушения. Как будет видно из раздела, посвященного приготовлению образцов это может представлять серьезную проблему в случае образцов с двойной меткой. Следовательно, нельзя не подчеркнуть особо то, что стандарты *должны* быть приготовлены тем же самым образом, что и образцы, содержащие двойную метку. Новички обычно совершают общую ошибку, используя стандарты, изготовляемые фирмами — производителями счетчиков для определения соотношения радиоактивностей в каналах. Эти стандарты чаще всего представляют собой радиоактивный толуол, растворенный в обычном толуоле в атмосфере аргона, т. е. условия приготовления стандарта практически исключают тушение — случай, который почти никогда не имеет места на практике.

Приготовление образцов

Метод приготовления образца может оказывать большое влияние на эффективность счета.

При использовании счетчика Гейгера — Мюллера образец обычно помещают на алюминиевый диск, называемый *подложкой,* и высушивают, если он является жидкостью. Нерастворимые образцы часто собирают на поверхности тонкого мембранного фильтра (гл. 7) и приклеивают на подложку. Принципиальной проблемой при подготовке образцов для счетчика Гейгера — Мюллера является самопоглощение; в том случае, когда образец достаточно толст, многие β-частицы теряют способность достигать счетчика, поскольку они поглощаются уже в самом образце, или они теряют столько энергии, что уже не в состоянии ионизировать газ в счетчике. Для β-частиц с достаточно высокой энергией (например, в случае ^{32}P) самопоглощение практически не является проблемой; для ^{14}C самопоглощение может стать заметным в образцах с массой более 1 мг; для ^{3}H оно настолько велико, что практически исключает применение счетчиков Гейгера — Мюллера. Трудности, связанные с самопоглощением, можно обойти, если использовать образцы различной толщины (т. е. различного объема) и определять скорость счета на единицу объема для каждого из них для того, чтобы выяснить, пропорционален ли счет объему. Если этого не наблюдается, строят график зависимости радиоактивности от объема, который далее используют для коррекции получаемых результатов. Как это делается, показано на рис. 5-6. Иногда к образцу бывает необходимо добавить идентичное соединение с высокой радиоактивностью для того, чтобы определить скорость счета и получить статистически достоверную корректировочную кривую.

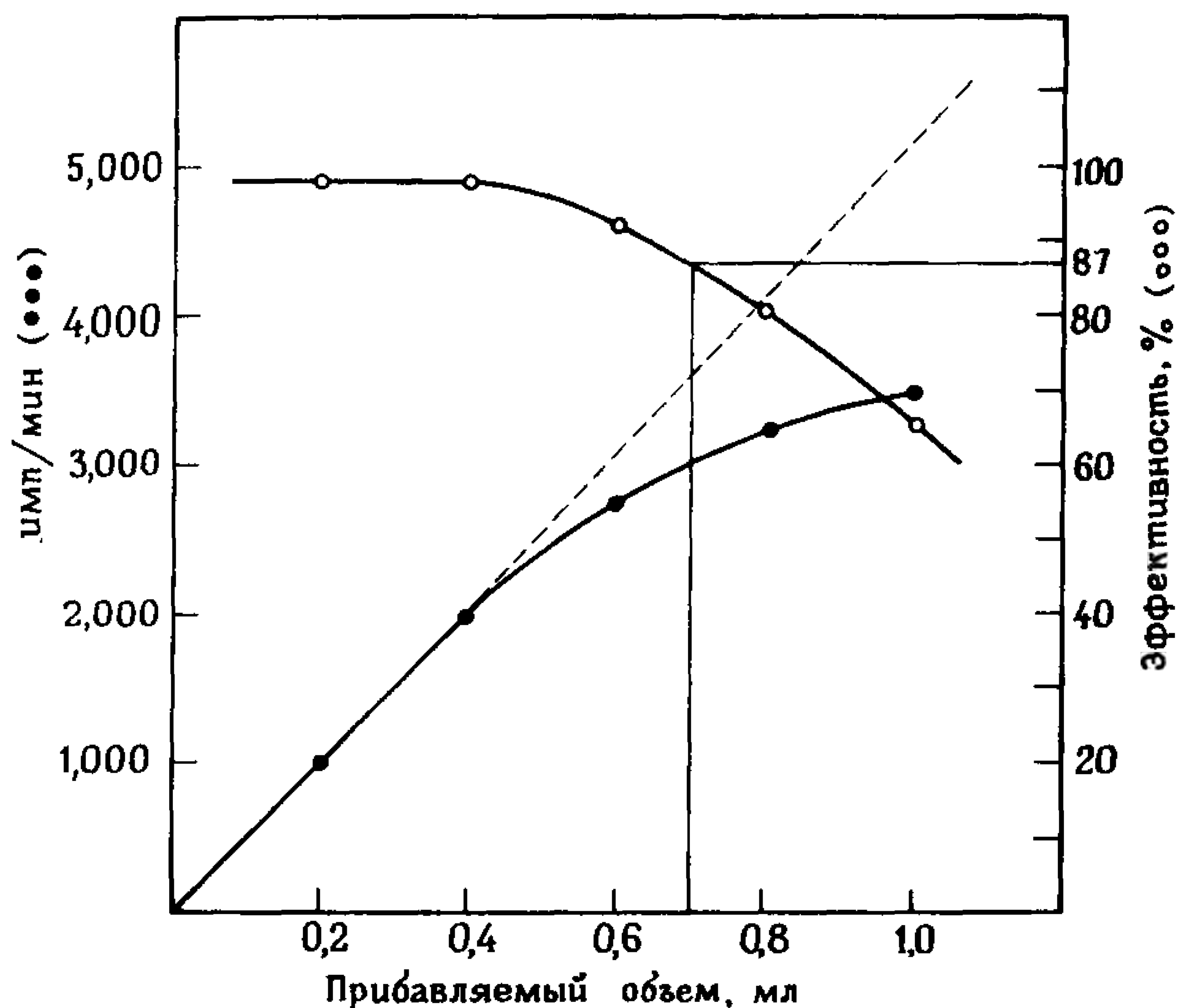


РИС. 5-6.

Доказательство самопоглощения.

Измеряемая радиоактивность непропорциональна прибавляемому объему. Пунктирная линия — радиоактивность, которая должна была бы быть при отсутствии самопоглощения; соотношение между сплошной кривой и штриховой линией дает эффективность (кривая обозначена светлыми кружками). Следовательно, если образец объемом 0,7 мл дает 4500 имп/мин, истинное значение составляет 4500/0,87=5184 имп/мин.

При использовании сцинтилляционных счетчиков образец в идеале должен быть растворен в жидком сцинтилляторе, так как при этом достигается наилучший контакт каждого радиоактивного атома с растворителем. Если же образец нерастворим, он будет существовать в виде небольших частиц или агрегатов, и энергия некоторых β-частиц при прохождении через агрегаты будет понижаться, т. е. будет происходить самопоглощение. Как уже отмечалось выше, это не является серьезной проблемой для частиц с высокой энергией, но служит препятствием при определении ^{3}H. В общем случае растворимость имеет принципиальное значение при работе с биологическими объектами, поскольку используемые флуоресценты обычно растворимы только в неполярных растворителях, в которых биологические молекулы, как правило, нерастворимы.

Существует три основных метода приготовления биологических образцов для сцинтилляционных счетчиков: 1) сцинтилляционный растворитель выбирается таким, чтобы он позволял прибавлять водные растворы, причем растворенное вещество должно при этом оставаться в растворе; 2) нерастворимое вещество фи-

зическими или химическими методами превращается в растворимую форму; 3) нерастворимые вещества собираются на нитроцеллюлозных фильтрах, стеклянном волокне или бумажных фильтрах и затем высушиваются. Первые два метода приводят к появлению тушения. Методы решения этой проблемы описаны ниже. Третий метод является быстрым и удобным, но также вносит несколько проблем.

Выбор растворителя, смешиваемого с водой

Обычные сцинтилляционные жидкости, приготовленные на основе толуола, не смешиваются с водой. Сцинтилляторы на основе диоксана позволяют вводить в них до 29% воды, но диоксан менее эффективен при переносе энергии, чем толуол. Свойства диоксановых сцинтилляторов могут быть улучшены путем добавки нафталина для повышения эффективности и различных спиртов или простых эфиров для увеличения растворимости нафталина при добавлении воды. Один из самых распространенных сцинтилляторов на основе диоксана называют сцинтиллятором Брэя. В каждой системе добавки вызывают тушение, но обычно этим можно пренебречь, если измеряется относительное количество радиоактивности, поскольку тушение будет одним и тем же во всех образцах. Однако прибавление к образцу воды и растворенных в воде солей приводит к тушению, которое увеличивается по мере увеличения количества воды. Обычно воду или раствор прибавляют к каждому образцу таким образом, чтобы общее количество прибавляемого вещества было одним и тем же во всех образцах анализируемой серии. Другим вариантом может быть определение степени тушения в каждом образце, которое кратко будет описано ниже.

Средний пробег β-частиц, испускаемых ^{3}H, в воде составляет приблизительно 0,5 мкм. Следовательно, если бы осадок или нерастворимое вещество можно было бы подвергнуть диспергированию так, чтобы размер получаемых частиц был много меньше 0,5 мкм, потери за счет самопоглощения были бы малы. Это может быть осуществлено несколькими способами. Если добавлять поверхностно-активное вещество, например тритон-X100, или эмульгатор, например Cab—O—Sil, то в толуольный сцинтиллятор можно ввести до 10% воды. При этом образуется эмульсия с капельками воды размером не более 0,1 мкм. Другими эмульгирующими смесями являются PCS и Aquasol (New England Nuclear Corporation). Альтернативным методом является фильтрование образца через тонко измельченную диатомовую землю (целит, Johns-Manville Corporation) с последующим счетом без добавления эмульгатора. Следует отметить, что принцип действия последнего метода неясен.

Растворение образца

Кислые вещества, такие, как белки и полипептиды, кислые полисахариды и нуклеиновые кислоты, могут быть превращены в форму, растворимую в сцинтилляторе, в результате реакции с органическими основаниями. Важнейшие из таких оснований — гиамин 10-Х-гидроксид и примен 81-R (высокомолекулярные четвертичный и первичный амины соответственно). Для веществ, меченных ^{14}C, иногда применяют методику, заключающуюся в сжигании образца и улавливании радиоактивного CO_2 с помощью пропускания через гиамин. Нерастворимые соединения основного характера, такие, как ионы металлов, растворяют при обработке 2-этилкапроновой кислотой или кислыми диалкилфосфатами. Большинство этих методов технически сложны и приводят к появлению значительного тушения.

Сорбция на мембранных фильтрах

Нерастворимые образцы обычно отфильтровывают или сушат на бумажных фильтрах — удобный способ удаления воды. Однако этот распространенный метод имеет два недостатка: 1) эффективность счета зависит от ориентации бумаги во флаконе счетчика (это связано с тем, что бумага светонепроницаема в сцинтилляционных растворах и задерживает часть фотонов) и 2) очень маленькие молекулы (например, аминокислоты и пурины) проникают в бумагу и становятся недоступными для растворителя.

Серьезным улучшением методики является отделение тонких осадков на мембранных фильтрах из нитроцеллюлозы (например, Millipore, Schleicher and Schuell и Gelman) или, что даже лучше, на бумагах из стекловолокна, как описано в гл. 7. Вероятно, этот метод является наиболее распространенным для приготовления образцов в современной биохимии, поскольку он быстр и удобен, хотя и не устраняет возможности самопоглощения, особенно в том случае, когда концентрация вещества превышает 1 мг/см^2. Подробно метод будет обсуждаться в следующем разделе. Применение нитроцеллюлозных фильтров имеет специфические особенности. После того как образец отделен, фильтр обычно сушат при 100°С для удаления следов воды с тем, чтобы предотвратить химическое тушение. Иногда при этом возникает желтая окраска или обугливание, вызываемое нагреванием. Окрашенный материал переходит в сцинтилляционный раствор и поглощает фотоны, испускаемые флуоресцентом в сине-фиолетовой области. В ряде случаев возникновение желтой окраски происходит неожиданно и часто вызывает потерю воспроизводимости при работе с одними и теми же образцами.

Наиболее эффективными средствами предотвращения возникновения окраски служат либо промывание образца органическим растворителем для быстрой сушки, либо понижение температуры сушки до 80°С. Возможность возникновения окраски подложки исключается при замене нитроцеллюлозных фильтров фильтрами из стекловолокна. Стекловолокно имеет также то преимущество, что по неизвестным причинам оно приводит к повышению эффективности счета в сцинтилляторах на основе толуола и, как отмечалось выше, снимает проблему светового тушения за счет появления окраски при высокотемпературной сушке.

Определение эффективности счета с помощью анализа амплитуды импульсов

Если требуется определить *абсолютное* число распадов, необходимо знать эффективность счета. Отметим, что в большинстве экспериментов этого обычно не требуется. Наиболее часто встречается ситуация, когда сравнивают радиоактивность нескольких образцов; при этом достаточно быть уверенным, что эффективность счета одна и та же для всех образцов. Это соблюдается не всегда, так как образцы могут иметь различный химический состав, что часто приводит к различным уровням химического тушения, светового тушения или тушения за счет разбавления. Более того, зачастую приходится сравнивать растворимый образец с нерастворимым или два нерастворимых образца с различными физическими свойствами.

Обычно приходится иметь дело с химическим тушением. Наиболее распространенными методами для определения степени тушения служат методы *отношения каналов, внешней стандартизации и внутренней стандартизации.* В основе двух первых методов лежит тот факт, что тушение понижает эффективность счета из-за сдвига спектра в область более низких энергий (рис. 5-7, *А*); при этом счет уменьшается вследствие того, что бо́льшая часть распадов не может быть зарегистрирована счетчиком, так как они становятся как бы однофотонными и отбрасываются схемой совпадений, или энергия импульсов становится ниже уровня L1, необходимого для понижения шума фотоумножителя. Заметим, однако, что сравнивая спектры с тушением и без тушения между двумя парами уровней L1→L2 и L2→L3, можно увидеть, что тушение вызывает *относительное увеличение* числа отсчетов в канале А по сравнению с каналом Б (т. е. изменяется соотношение счета в каналах), хотя общее количество отсчетов *понижается.* Следовательно, метод отношения каналов заключается в при-

готовлении набора стандартов с различными уровнями тушения (например, с помощью добавления таких тушителей, как вода или хлороформ) и построении кривой зависимости числа регистрируемых импульсов от отношения числа зарегистрированных импульсов в каналах А и Б (рис. 5-7, *Б*). Таким образом, для образца, в котором ожидают тушение, счет производится в той же паре каналов, что и для стандарта, рассчитывают отношение и процент тушения определяют по кривой, приведенной на рис. 5-7, *Б*. Например, если для некоторого образца измерена радиоактивность в 500 имп/мин, а измеренная методом отношения каналов эффективность счета составляет 20%, радиоактивность образца без тушения составляет 500/0,20=2500 имп/мин.

В *методе внешней стандартизации* необходимо использование источника радиоактивности (обычно ^{137}Cs), помещаемого вне флакона, но внутри счетчика и облучающего образец γ-лучами. При прохождении γ-лучей через растворитель образуется некоторое количество электронов, которые регистрируют тем же способом, что и β-частицы. В образце с тушением энергетический спектр этих электронов также сдвигается, в результате чего может быть установлена зависимость эффективности счета от отношения счета в каналах (рис. 5-7, *В*). Преимущество метода внешней стандартизации перед методом отношения каналов состоит в том, что γ-источник обеспечивает очень высокую скорость счета ($\sim 10^5$ имп/мин) и поэтому большую статистическую достоверность (вспомните правило $N^{1/2}$ из примера 5-А). Этот метод особенно ценен, если радиоактивность исследуемого образца слишком мала для применения метода отношения каналов.

Новейшие приборы, снабженные компьютерами, сконструированы таким образом, чтобы использовать метод внешней стандартизации и автоматически вносить поправку на тушение до вывода данных на печатающее устройство.

Если образец затушен и содержит две метки, для определения тушения требуются специальные приемы (если такое определение возможно). Описание таких методов обычно приводится в инструкции к счетчикам или в специальной литературе, ссылки на которую приведены в конце этой главы.

Третий метод определения эффективности — метод *внутренней стандартизации* — заключается в следующем. После счета образца к нему добавляют известное количество меченого соединения, не дающего тушения, после чего образец считают вновь. Эффективность счета рассчитывают исходя из отношения наблюдаемой радиоактивности к известной. Хотя этот метод и выглядит безупречным, все же и здесь существуют две проблемы: 1) объем прибавляемого вещества, как правило, настолько мал, что при его измерении допускается значительная (3—5%) ошибка, и 2) образец после этого становится непригодным для повтор-

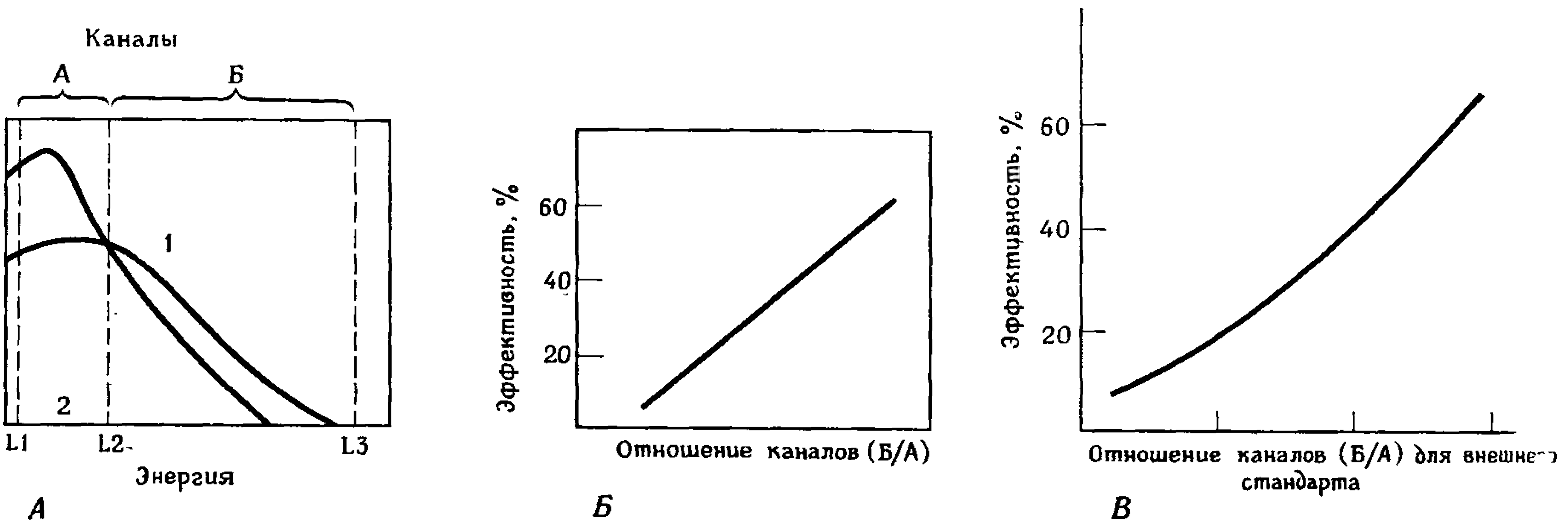


РИС. 5-7.

А — сдвиг спектра, вызываемый тушением; каналы остаются постоянными. *Б* — кривая для коррекции тушения методом отношения каналов. *В* — кривая для коррекции тушения методом внешней стандартизации.

1 — без тушения; *2* — с тушением.

ных измерений. Метод внутренней стандартизации используют редко, поскольку он обладает указанными выше недостатками и требует однообразной утомительной работы.

Методы внутренней и внешней стандартизации могут использоваться для поправки на световое тушение и тушение за счет разбавления. Однако проще прибегать к окислению окрашенных образцов H_2O_2, что обычно приводит к устранению окраски. Тушение же за счет разбавления удобнее учитывать с помощью ряда последовательных разбавлений образца сцинтилляционным раствором. Затем строят график зависимости радиоактивности в единице объема от концентрации образца и проводят экстраполяцию к нулевой концентрации. Этот метод требует довольно больших затрат времени, но дает вполне удовлетворительные результаты.

Очень важно не смешивать понятия самопоглощения и тушения. Корректировка тушения, обсуждавшаяся выше, вносит поправку только на изменения β-спектра, связанные со свойствами сцинтилляционного раствора, и не дает информации о степени самопоглощения. При работе с нерастворимыми образцами или частицами, собираемыми на фильтре, потери будут вызываться физическими свойствами самого образца *. Вообще самопоглощение является сложной проблемой и часто служит главной причиной низкой эффективности счета. Это относится в особенности к изучению таких макромолекул, как белки и нуклеиновые кислоты, поскольку наиболее общей методикой приготовления образцов является осаждение макромолекулы кислотой (соляной, хлорной или трихлоруксусной) и отделение осадка на фильтре. При наличии самопоглощения некоторого увеличения эффективности счета удается добиться с помощью уменьшения размеров образца, если образец очень велик, и при фильтровании, так как осадок может образовывать толстый слой. Однако разбавление не всегда устраняет самопоглощение вследствие того, что большинство веществ и без того имеет минимальный размер частиц, который не уменьшается при разбавлении. К сожалению, в случае β-частиц с низкой энергией, таких, как у ^3H, самопоглощение, обусловленное такими микрочастицами, всегда вносит некоторый вклад. Вообще самопоглощение не может быть устранено никаким другим методом, кроме переведения исследуемого вещества в раствор.

---

* На первый взгляд может показаться, что все дело заключается в фильтре, поскольку материал фильтра способен задерживать проходящие через него β-частицы. Однако, как это ни парадоксально, значение фильтра невелико, так как на счет нерастворимых образцов мало влияет то, что они находятся на фильтре. Предполагают, что частицы расположены на поверхности фильтра и при этом практически окружены растворителем.

Наилучшим способом *счета относительных количеств* радиоактивности в различных нерастворимых образцах является тот, который позволяет получить все образцы максимально близкими по свойствам. Один из таких методов состоит в прибавлении известного количества осаждающегося материала (например, ДНК или альбумина бычьей сыворотки) к каждому образцу таким образом, чтобы уменьшить *различия* в количествах осадка в серии образцов. Если приходится сравнивать растворимый образец с нерастворимым (например, при сравнении удельных радиоактивностей белка и аминокислоты, используемой в синтезе), единственным путем для получения высокой точности служит растворение образцов и счет их в идентичных смесях.

Следует сказать несколько слов о предосторожностях, которые надо соблюдать при растворении образцов на фильтрах. Если нерастворимый образец на фильтре поместить в растворитель, способный растворять материал фильтра (например, диоксан для нитроцеллюлозных фильтров), иногда может показаться, что образец растворяется, хотя в действительности растворяется только фильтр, а образец продолжает оставаться в прежнем состоянии. Таким образом, этот прием не устраняет проблемы самопоглощения.

Регистрация γ-лучей

γ-Радиоактивные препараты в последнее время приобрели большое значение в биохимии и особенно в радиоиммунологических исследованиях (гл. 10), при которых антитела или другие белки часто метят γ-радиоактивным ^{125}I. Этот вид излучения легко регистрируют и измеряют радиоактивность γ-излучателей с помощью производимых серийных γ-счетчиков, где применяется внешний сцинтилляционный детектор, который работает по следующему принципу. Образец помещают в стеклянный или пластмассовый флакон и вводят внутрь большого кристалла NaI, активированного таллием [NaI(Tl)]; это носит название счета в колодце (рис. 5-8). Поскольку γ-лучи имеют очень высокую энергию, они выходят за пределы образца и флакона без заметной потери энергии. С выходом в несколько процентов за время прохождения через кристалл они приводят к появлению электронов. Эти электроны в свою очередь возбуждают близлежащие части кристалла, в результате чего возникает флуоресценция, регистрируемая фотоумножителями. Как и в жидкостном сцинтилляционном методе, соответствующая электронная аппаратура превращает свет в регистрируемые электрические импульсы. При измерении γ-радиации нет необходимости в схеме совпаде-

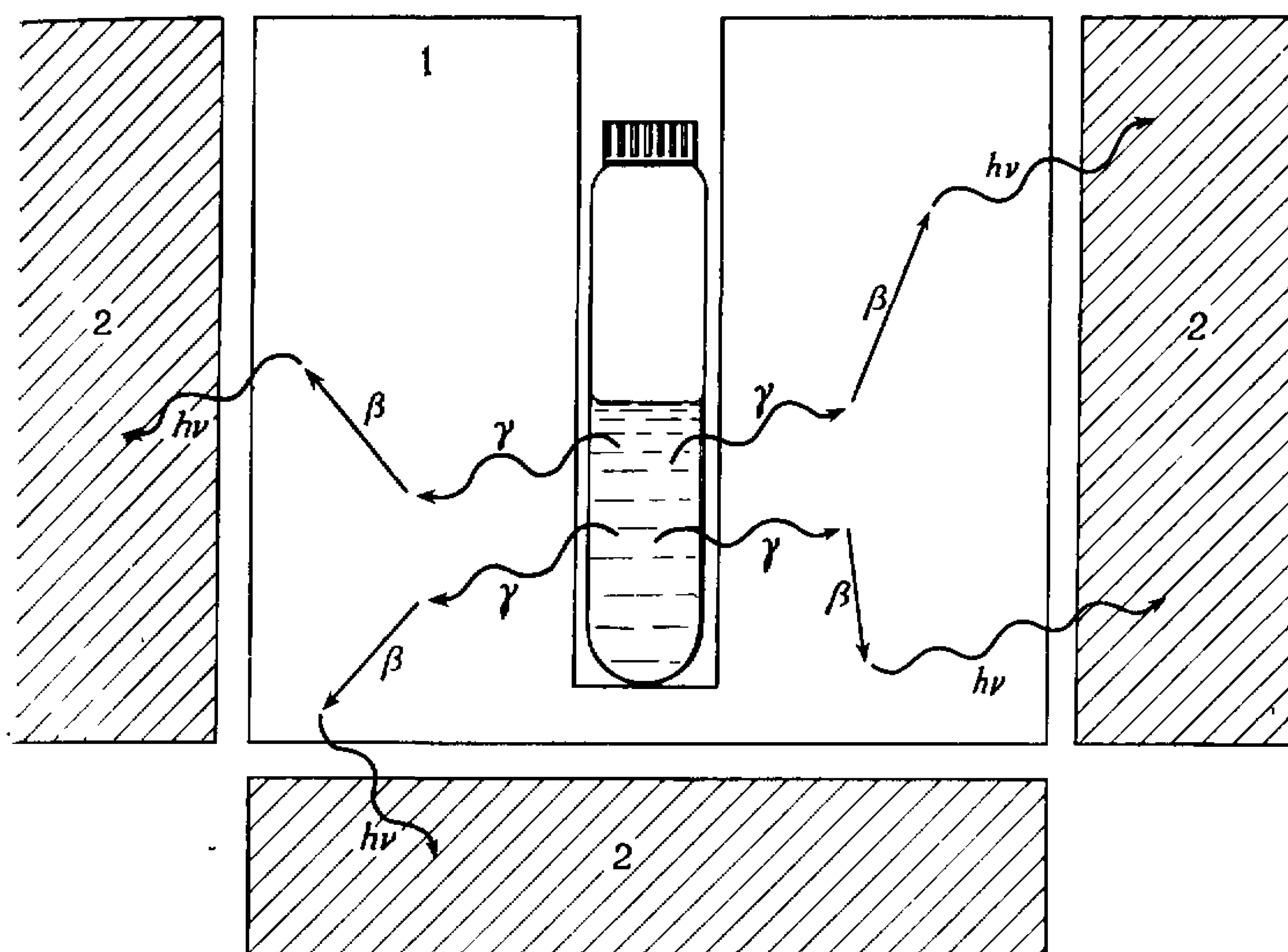


РИС. 5-8.

Колодезный счет γ-лучей.

γ-Лучи взаимодействуют с кристаллом, давая β-частицы, которые возбуждают кристалл с последующим образованием фотонов (hν), которые могут регистрироваться фотоумножителями. *1* — монокристалл NaI(Tl); *2* — фотоумножители.

ний, поскольку энергия γ-лучей настолько велика по сравнению с шумом фотоумножителей, что напряжение, определяемое низшим уровнем анализатора амплитуды импульсов (т. е. L1 в жидкостном сцинтилляционном методе), может устанавливаться выше импульсов фона. Обычно система оснащается несколькими фотоумножителями, *действующими независимо,* для повышения эффективности счетчика.

Как и при жидкостном сцинтилляционном счете, в случае γ-излучающих источников возможно проведение экспериментов с двойной меткой. Аналогичным образом, поскольку величины импульсов зависят от энергии γ-лучей, можно использовать анализ амплитуды импульсов для одновременного определения различных изотопов — например, ^{125}I и ^{131}I. Подробное обсуждение γ-спектрометрии можно найти в литературе, список которой приведен в конце главы.

Примеры использования радиоактивных препаратов

Этот раздел включает ряд примеров использования радиоактивности в биохимии и молекулярной биологии. Радиоактивные изотопы могут применяться: 1) для обнаружения веществ в количествах, слишком малых для прямого химического обнаружения, 2) для различения идентичных молекул, находящихся в различных участках биоструктур, 3) для анализа смесей, которые слишком сложны для традиционного химического анализа, и 4) для установления участия в реакции, когда продукты невозможно отличить от реагентов химическими методами. Первая ситуация иллюстрируется примерами 5-В и 5-З, вторая — 5-Б и 5-Д, третья — 5-Е и 5-Ж и четвертая — 5-И.

Пример 5-Б. *Реакции ДНК-полимеразы I Escherichia coli.* Если очищенную ДНК-полимеразу I прибавить к реакционной смеси, содержащей буфер, Mg^{2+}, ДНК и четыре дезоксирибонуклеозид-5′-трифосфата (аденина, тимина, гуанина и цитозина), меченных ^{32}P в α-положении (ближайшем к остатку дезоксирибозы), и инкубировать при 37°С, вещество, содержащее ^{32}P, становится нерастворимым в 10%-ной трихлоруксусной кислоте (ТХУ) и может быть отделено на мембранном фильтре, что указывает на образование из трифосфатов ДНК, поскольку именно ДНК в отличие от нуклеозидтрифосфатов нерастворима в ТХУ. Заметим, что вновь синтезированная ДНК отличается от матричной ДНК благодаря своей радиоактивности. Если присутствуют только три дезоксирибонуклеозид-5′-трифосфата, или при отсутствии Mg^{2+} или ДНК, или в том случае, когда вместо дезоксирибонуклеотидов взяты рибонуклеотиды, ^{32}P остается в растворе. Отсюда следует, что полимеризация требует присутствия всех четырех *дезокси*рибонуклеозид-5′-трифосфатов, ионов Mg^{2+} и ДНК. При замене одного из трифосфатов на моно- или дифосфат ^{32}P также остается в растворе (т. е. полимеризация не идет); следовательно, необходимо наличие в субстрате именно трифосфатной группы. Если дезоксирибонуклеозид-5′-трифосфаты несут ^{32}P и β- или γ-положении и ^{14}C в остатке дезоксирибозы, ^{14}C, а не ^{32}P становится нерастворимым в кислоте. (^{14}C и ^{32}P можно различить методом жидкостного сцинтилляционного счета.) Это означает, что β- и γ-фосфатные группы отщепляются во время реакции, а в полимере остаются только α-фосфатные группы. Таким образом, использование радиоактивности позволяет различить определенные фосфатные группы.

Пример 5-В. *Определение молекулярной массы ДНК с помощью метки по концевой группе.* Фермент полинуклеотидкиназа

из *E. coli* переносит γ-фосфат с аденозин-5′-трифосфата (АТФ) на 5′-концевую гидроксильную группу ДНК. Обычно ДНК содержит два 5′-фосфорильных конца (по одному в каждом полинуклеотидном тяже), которые могут быть превращены в 5′-гидроксильные группы под действием фермента щелочной фосфатазы. В лаборатории при университете Брандейс 4,7 мкг очищенной гомогенной (в том смысле, что все молекулы были одного размера) ДНК фага λ с 5′-гидроксильными концами вводили в реакцию с γ-^{32}P-АТФ с удельной радиоактивностью 3 мКи/мкмоль, используя полинуклеотидкиназу. После осаждения кислотой образец показал радиоактивность 1870 имп/мин при использовании счетчика с 85%-ной эффективностью по ^{32}P. Таким образом, осадок содержал 1870/0,85 или 2200 расп/мин ^{32}P. В единицах микрокюри это составляет $2200/(2{,}2\cdot10^6)=10^{-3}$ мкКи. Из удельной радиоактивности 10^{-3} мкКи эквивалентно $3{,}3\cdot10^{-7}$ мкмоль АТФ или $1{,}98\cdot10^{11}$ молекул. Так как было прибавлено 4,7 мкг фага λ ДНК, масса одной молекулы фага λ ДНК составляет $4{,}7/(9{,}9\cdot10^{10})=4{,}7\cdot10^{-11}$ мкг, или $31{,}0\cdot10^6$ единиц атомной массы. В данном случае радиоактивность служит для высокоточного измерения фосфорилирования 5′-гидроксильных групп. Этим же способом можно отличить новые концевые фосфорильные группы от старых 5′-фосфорильных групп.

Пример 5-Г. *Идентификация «скрытых» остатков тирозина в гипотетическом белке.* Тирозин является единственной аминокислотой, которая может иодироваться. Пусть гипотетический белок по данным аминокислотного анализа содержит шесть остатков тирозина. При реакции 1 мкг такого белка с ^{131}I можно было осадить трихлоруксусной кислотой и отделить на фильтре из стекловолокна препарат с радиоактивностью 2550 имп/мин. Если же реакцию проводили в присутствии денатурирующего агента при полном нарушении третичной структуры белка, в осадке наблюдали радиоактивность, равную 3820 имп/мин. Следовательно, имеются $(2550/3820)\cdot6\approx4$ остатка тирозина, способных иодироваться в случае, когда белок обладает нативной конфигурацией. Отсюда 6—4=2 остатка тирозина недоступны и, следовательно, «скрыты» в трехмерной структуре. В этом случае радиоактивность позволяет определить иод в белке в количествах, слишком малых для определения химическими методами.

Пример 5-Д. *Проницаемость бактерий для адениловой кислоты (АМФ).* Не все радиоактивные препараты, будучи прибавлены к бактериальной культуре, могут проникать в бактерии. Если радиоактивное вещество все же попало в бактерию и бактерия затем отделена фильтрованием, радиоактивность будет проявляться на фильтре. Если же этого не произошло, радиоактивность пройдет через фильтр и осадок может быть полностью от-

мыт от нее. Например, при добавлении ^{32}P-АМФ или ^{3}H-АМФ (с ^{3}H в пуриновом кольце) к культуре бактерий *E. coli* после периода роста бактерии отделяли на мембранном фильтре и промывали буфером. В результате на фильтре не было обнаружено ни ^{3}H, ни ^{32}P. Следовательно, АМФ не включается в бактерию. Кроме того, можно различить прибавленный АМФ и АМФ, который всегда присутствует в клетках. Если бы в клетки включалось количество АМФ, равное 0,1% от всегда присутствующего в бактерии, увеличение на такое количество не могло бы быть определено химическими методами. При использовании же радиоактивного материала 0,1%-ное количество легко определить на нулевом фоне нерадиоактивного внутриклеточного АМФ.

Так как в этом примере применялся как ^{32}P-АМФ, так и ^{3}H-АМФ (с ^{3}H в пуриновом кольце), отсутствие включения обеих меток дает возможность сделать также вывод о том, что клетки не расщепляют внешний АМФ с образованием аденозина и фосфата, поскольку известно, что оба эти вещества способны проникать в клетку. Это существенно в связи с тем, что имеются случаи, когда перед попаданием в клетку вещество подвергается расщеплению, например тимидин расщепляется с образованием тимина.

Пример 5-Е. *Идентификация вещества по реакции с антителом.* Если бактерию *E. coli,* растущую на среде, где единственным источником углерода служит ^{14}C-глюкоза, инфицировать фагом Т4 и зараженные клетки выращивать дальше, то синтезируются фагоспецифические белки. Если зараженные клетки разрушить и добавить антитела, специфичные к очищенным белкам отростка фага Т4, наблюдается осаждение ^{14}C. Если клетки разрушать через различные промежутки времени, по количеству осаждаемого ^{14}C можно определить зависимость скорости синтеза белков отростка от времени. Аналогичный анализ можно провести и для клеток, инфицированных фагом Т5, с антителами, специфичными к белкам отростка фага Т5. Однако, если клетки одновременно инфицировать фагами Т4 и Т5 и вслед за этим разрушить, ^{14}C будет осаждать антитела, специфичные к фагу Т4, но не к фагу Т5. Следовательно, белки отростка фага Т5 не синтезируются в условиях такого двойного заражения. Такой эксперимент практически невозможно провести без использования радиоактивной метки, поскольку приходится идентифицировать малое количество белков отростка в чрезвычайно сложной смеси, представляющей собой лизат клеток плюс антисыворотку.

Пример 5-Ж. *Очистка белка, для которого нет подходящих химических или биологических методов тестирования.* Белки обычно определяют, измеряя их биологическую активность (например, ферментативную или ингибирующую в некоторых реак-

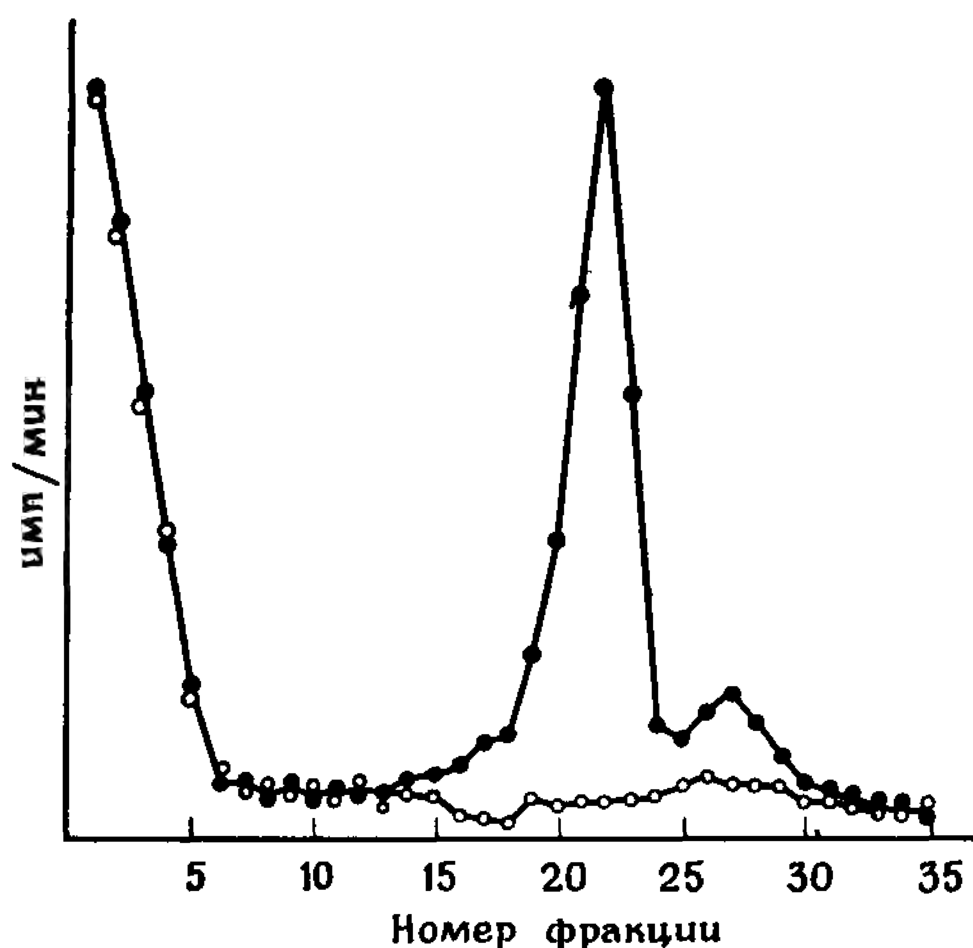


РИС. 5-9.

Использование техники двойной метки при очистке белка.

Неиндуцибельный лизогенный штамм бактерии *E. coli* подвергали УФ-облучению, чтобы подавить синтез белка. Затем клетки инфицировали диким видом фага λ в присутствии ^{3}H-лейцина или λcIsus10 (который отвечает за синтез короткого фрагмента λ-репрессора) в присутствии ^{14}C-лейцина. Белки выделяли из каждой культуры, смешивали и хроматографировали на ДЭАЭ-целлюлозе (гл. 8). Кривая элюирования с хроматографической колонки показана в виде количеств ^{3}H и ^{14}C в каждой фракции, элюируемой с колонки. Пик радиоактивности ^{3}H не сопровождается соответствующим пиком ^{14}C и отвечает белку, синтезируемому при заражении фагом λ дикого типа, но не заражению λcIsus10, т. е. λ-репрессору. Таким образом впервые было проведено обнаружение λ-репрессора. ● ^{3}H; ○ ^{14}C. (Любезно предоставил Марк Пташне.)

циях) или на основании физических свойств, позволяющих различать отдельные белки (таких, как спектральные свойства гемоглобина). Однако когда определение такими методами невозможно, то используют методику двойной метки, описанную ниже. Если инфицированную фагом бактерию, способную продуцировать определенный белок, выращивать в среде, содержащей ^{3}H-лейцин, все ее белки будут включать ^{3}H. Если же выращивать в среде с ^{14}C-лейцином мутантную бактерию, продуцирующую только фрагмент какого-либо белка, все белки будут включать метку, но не будут образовывать интересующего нас ^{14}C-меченого интактного белка. При смешивании меченных таким образом двух культур и выделении общего белкового препарата фракционирование с помощью хроматографии приведет к тому, что большинство фракций будет обладать фиксированным отношением ^{3}H/^{14}C. Интересующий нас белок будет при этом находиться во фракции с наибольшим отношением ^{3}H/^{14}C (рис. 5-9). Следовательно, схема очистки может быть основана на достижении максимального значения этого отношения так, чтобы в ито-

ге получить фракцию, содержащую исключительно ^3H без примеси ^{14}C. Если все белки включали метку, нужный белок при этом получается химически чистым (это, конечно, не так в случае клеток, инфицированных фагом, поскольку при этом большинство бактериальных белков будут нерадиоактивны).

Пример 5-З. *Седиментационный анализ структуры ДНК бактериофага в суперинфицированной лизогенной бактерии.* Если лизогенные фагом λ бактерии *E. coli* снова инфицировать фагом λ, образования фага не наблюдается. Судьба входящей ДНК может быть определена путем выделения всех внутриклеточных ДНК и анализом смеси методом зонального центрифугирования в градиенте плотности (гл. 11). Анализ может быть основан на том факте, что ДНК фага λ обладает молекулярной массой ($3 \cdot 10^7$), отличающейся от молекулярной массы ДНК *E. coli* ($2,6 \cdot 10^9$), однако этот способ не совсем корректен, поскольку ДНК *E. coli* в ходе выделения обычно расщепляется на фрагменты различной величины. Вопрос состоит в том, как отличить ДНК *E. coli* и фага λ. Это легко осуществимо, если ДНК фага λ будет радиоактивной, поскольку при анализе вся радиоактивность должна находиться только в ДНК фага λ. Поэтому для инфицирования лизогенных бактерий *E. coli* можно использовать ^3H-λ. Суммарный препарат ДНК после выделения анализируют с помощью ультрацентрифугирования. После седиментации содержимое центрифужных пробирок фракционируют и определяют радиоактивность в каждой фракции. Данные, полученные в таком эксперименте, показаны на рис. 5-10, *А*. Отсюда следует, что большая часть ДНК превращается в скрученные кольца, не способные к репликации. На рис. 5-10, *Б* показан результат, получаемый в том случае, когда не используется радиоактивный фаг. Поскольку соотношение бактериальной и фаговой ДНК составляет около 150, трудно распознать какой-либо пик из показанных на рис. 5-10, *А*.

Пример 5-И. *Изучение обменных реакций.* Поскольку обменные реакции приводят к образованию веществ, химически идентичных исходным, традиционный химический анализ не способен установить, проходит ли и, если проходит, то насколько, такая реакция. Однако обмен — или, в более широком смысле, участие — легко поддается изучению с применением радиоактивных изотопов, как показывают два следующих примера.

Пиридоксальфосфат служит кофактором во многих ферментативных реакциях. При применении ^3H-пиридоксальфосфата обнаружено, что ^3H из некоторых положений переходит в воду в виде ^3H_2O. Связанный с ферментом меченый пиридоксальфосфат можно удалить из воды с помощью гель-проникающей хроматографии (гл. 8), а ^3H в воде можно определить путем прямого

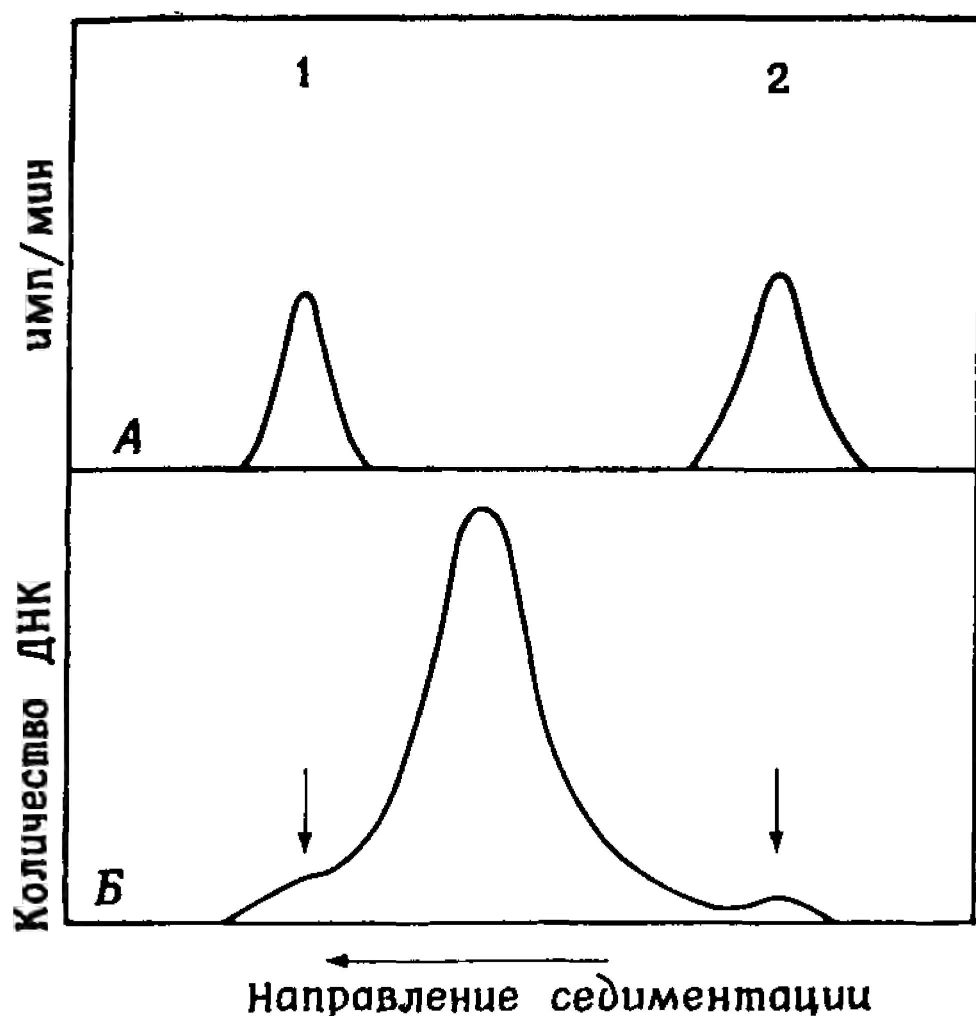


РИС. 5-10.

Сравнение экспериментов, проведенных с использованием и без использования радиоактивности.

Штамм бактерии *E. coli*, лизогенный по фагу λ, заражали фагом λ. Известно, что вводимая ДНК превращается в смесь открытых и ковалентно замкнутых колец, которые легко можно различить, исследуя их седиментацию в градиенте щелочного раствора сахарозы (гл. 11). Изображены две картины седиментации. График *А* получен при использовании фага, меченного ^3H-тимидином, и на нем изображена только радиоактивная ДНК. Две формы здесь легко различаются. На графике *Б* изображена зависимость концентрации всей ДНК от градиента, поскольку использовался нерадиоактивный фаг. Так как бактериальная ДНК присутствует в большом избытке, ДНК фага проявляется в виде плохо различимых горбиков. *1* — ковалентно замкнутые кольца; *2* — открытые кольца.

прибавления воды к сцинтилляционному раствору, способному смешиваться с водой. Обнаружение ^3H в воде указывает на прямое участие пиридоксальфосфата в реакции посредством переноса протона.

ДНК представляет собой двухтяжевой полинуклеотид, связанный водородными связями. Если к ДНК прибавить ^3H_2O и затем отделять ее через различные промежутки времени методом гель-проникающей хроматографии, в ДНК окажется некоторое количество ^3H. Из кинетики обмена и влияния различных денатурирующих агентов можно заключить, что водородные связи последовательно разрываются и вновь образуются. Это явление называется «дыханием». Аналогичный подход применяют и при определении скорости укладки и развертывания белков (гл. 18).

Пример 5-К. *Идентификация активных центров ферментов.* Радиоактивные изотопы играют важную роль в идентификации активных центров ферментов, поскольку ферментативные реак-

ции требуют настолько малых концентраций фермента, что необходимы колоссальные объемы (если, конечно, фермент достаточно доступен), чтобы получить необходимое количество вещества для традиционного химического анализа. Приведем простой пример определения числа центров связывания.

Ковалентный характер связывания 1-амино-2-бромэтана с активным центром аминооксидазы плазмы быка можно легко продемонстрировать, если второй атом углерода заменить на ^{14}C. Измерение отношения числа молей связанного ^{14}C к числу молей фермента дает число центров связывания. С помощью гидролиза белка на аминокислоты и идентификации типа химической связи можно идентифицировать место связывания (т. е. аминокислоту). Если известна аминокислотная последовательность изучаемого фермента, гидролиз до пептидов позволяет установить положение аминокислоты в белковой цепи.

Список литературы

Birks J. B., Theory and Practice of Scintillation Counting, Pergamon, 1964.

Kobayashi Y., Maudsley D. V., Practical Aspects of Liquid Scintillation Counting, in "Methods of Biochemical Analysis", vol. 17, edited by D. Glick, Interscience, 1969, pp. 55—133.

Millipore Corporation, Multiple Sample Filtration and Scintillation Counting.

Много полезной информации содержится в руководствах к различным сцинтилляционным счетчикам и в брошюрах, выпускаемых фирмами — изготовителями радиоактивных препаратов.

Задачи

5-1. Удельная радиоактивность метил-^3H-тимидина составляет 6 Ки/ммоль. Какая часть молекул тимидина радиоактивна? Если ДНК имеет молекулярную массу $25 \cdot 10^6$ и мечена таким тимидином, причем 50% пар оснований составляет AT, то сколько атомов ^3H имеется в молекуле этой ДНК? Если счетчик имеет эффективность, равную 52%, какая масса ДНК даст счет 1000 имп/мин?

5-2. Если в эксперименте с двойной меткой одинаково просто применить ^3H, ^{14}C и ^{32}P, какую пару изотопов вы бы выбрали и почему?

5-3. Что лучше выбрать, ^3H-тимидин или ^{32}P, для эксперимента с измерением синтеза ДНК и почему?

5-4. Сцинтилляционный счетчик отрегулирован таким образом, что соотношение счета в каналах А и Б составляет 1000 для ^3H и 0,2 для ^{14}C. При этих условиях образец дает 1450 имп/мин в канале А и 1620 имп/мин в канале Б. Каковое соотношение ^3H и ^{14}C в образце?

5-5. В соответствии с задачей 5-4, если образец содержит ^3H-тимидин с радиоактивностью 6 Ки/ммоль и ^{14}C-уридин с радиоактивностью 0,5 Ки/ммоль, причем эффективность счетчика равна 26% для ^3H и 82% для ^{14}C, определите молярное соотношение тимидина и уридина в образце. Предположим, что тимидин находится в ДНК, содержащей 43% GC, а уридин находится в РНК, содержащей 28% уридина. Каковы массы ДНК и РНК, присутствующих в данном образце?

5-6. Поскольку ^{32}P вызывает разрыв тяжей в ДНК, для изучения целой ДНК целесообразно включать только один ^{32}P на молекулу ДНК. При этом, после того как ^{32}P распадется, ДНК перестает быть радиоактивной и, следовательно, не регистрируется. Если минимальная концентрация фосфата в среде роста, способная поддерживать развитие ДНК-содержащего бактериофага, составляет 10^{-3}M, сколько чистого ^{32}P требуется прибавить на 1 мл раствора, чтобы получить один ^{32}P на фаг, считая, что ДНК имеет молекулярную массу $20 \cdot 10^6$?

5-7. При счете образца в течение 1 мин найдена скорость счета, равная 752 имп/мин. Сколько минут требуется считать образец, чтобы ошибка измерения составляла 1%?

5-8. В сцинтилляционном счетчике образец измеряли с помощью двух фотоумножителей, по одному с каждой стороны флакона. Флакон с образцом способен вместить 20 мл растворителя. Считаете ли вы, что скорость счета будет зависеть от объема растворителя, если известно, что образец отделен на фильтре? Что можно сказать о значении фона?

5-9. Серию стандартных гасящих образцов считали в двух каналах. Когда все образцы содержали одно и то же количество добавленной радиоактивности (1000 имп/мин), наблюдали следующие значения имп/мин:

Образец	Канал А	Канал Б
1	502	500
2	478	425
3	445	354
4	410	290
5	379	227
6	332	170

Считается неизвестный образец. При этом в канале А регистрируется 1822 имп/мин, а в канале Б — 1211 имп/мин. Каково действительное значение радиоактивности для этого образца?

5-10. Определенный вид клеток должен расти в сложной питательной среде, содержащей большое число компонентов. Среда никогда не анализировалась. Вы хотите ввести метку в белок с помощью ^{14}C-лейцина, для чего прибавляете 100 мкл ^{14}C-лейцина с удельной радиоактивностью 50 мкКи/мкг и концентрацией 25 мкг/мл к 10 мл питательной среды. После роста клеток в этой среде в течение 1 ч отбираете 0,1 мл, собираете осадок после обработки кислотой и считаете его на счетчике с эффективностью 70% по ^{14}C. Предположим, что счетчик показал 1251 имп/мин. Известно, что образец объемом 0,1 мл содержит примерно 25 мкг белка, содержащего 4% лейцина. Сколько ^{14}C-лейцина требуется прибавить на 1 мл среды, чтобы увеличить количество отделяемой радиоактивности приблизительно до 5000 имп/мин?

5-11. Предположим, что вы имеете счетчик Гейгера — Мюллера с эффективностью 22% по ^{14}C и фоном 6 имп/мин, а также сцинтилляционный счетчик с эффективностью 72% по ^{14}C и фоном 38 имп/мин. В эксперименте с ^{14}C вы ожидаете, что ваш образец будет иметь очень малую радиоактивность — от 75 до 100 имп/мин. Какой счетчик вы предпочтете и почему?

ГЛАВА 6

Авторадиография

Авторадиография представляет собой метод, позволяющий локализовать радиоактивный материал в конкретной ткани, клетке, части клетки или даже в молекуле. Принцип авторадиографии состоит в том, что образец, содержащий радиоактивное вещество, вводится в прямой контакт с толстым слоем специально приготовленной фотографической эмульсии. При распаде радиоактивных атомов образца излучаемая радиация активирует отдельные зерна галогенида серебра в эмульсии, в результате чего они приобретают способность превращаться в металлическое серебро при обработке фотографическим проявителем *. Получающаяся после химического проявления картина показывает распределение радиоактивного материала в образце (рис. 6-1). Изображение рассматривают с помощью микроскопа. Получаемое изображение дает информацию о локализации радиоактивного материала в объекте или отдельных его частях и о количестве радиоактивного материала, которое можно определить по интенсивности изображения. В данной главе будет рассмотрена методическая сторона авторадиографии, принципы выбора подходящих изотопов и техники подготовки образца, трудности, возникающие в ходе работы, а также те вопросы, на которые можно получить ответы.

Ядерные эмульсии, используемые в биологических исследованиях

Ядерная эмульсия отличается от обычной фотопленки главным образом высоким содержанием зерен галогенида серебра в желатине (приблизительно равные количества галогенида серебра и желатины) и небольшим размером зерен (0,02—0,3 мкм). Обычно используют эмульсионные детекторы трех типов: нанесенные на предметное стекло, жидкие и покрывающие. Первый

* Все фотопленки представляют собой суспензию кристаллов галогенида серебра в желатине. Эти кристаллы обладают тем необычным свойством, что при воздействии света или радиации они активируются и приобретают способность под действием различных восстанавливающих агентов (проявителей) превращаться в металлическое серебро. В отсутствие такой активации они устойчивы к химическому восстановлению.

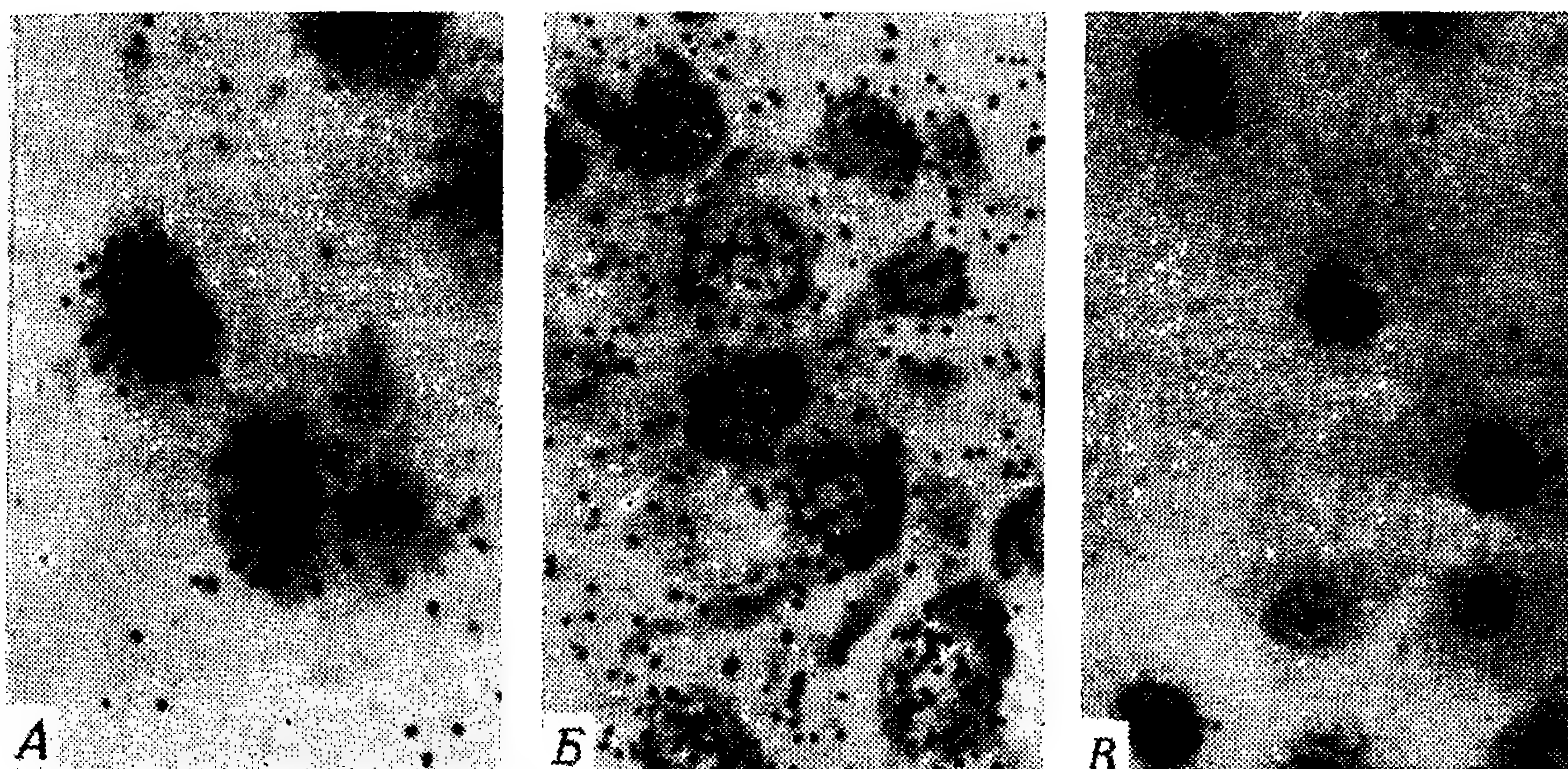


РИС. 6-1.

А — авторадиограмма, показывающая концентрацию радиоактивности в ядрах, выделенных из матки морской свинки, которая в течение 15 мин подвергалась действию 1,2,6,7-^{3}H-прогестерона. Ядра помещали на предметное стекло и покрывали ядерной эмульсией. Через 11 дней автоградиограмму проявляли для того, чтобы сделать видимыми гранулы серебра, а затем окрашивали метиловым зеленым с пиронином для проявления ядер. Видно, что прогестерон или соединение, образующееся из прогестерона, быстро локализуется в ядрах клеток матки. Увеличение 1100×. (*Stumpf W.*, in "Methods in Cell Biology", vol. 3, ed. by D. M. Prescott, Academic Press, 1976.) *Б* — авторадиограмма среза гиппокампа крысы, показывающая концентрацию ^{3}H-кортикостерона в ядрах нейронов через 1 ч после внутривенного введения. После нанесения тонкого среза на стеклянную пластину он был введен в контакт с ядерой эмульсией, и авторадиограмму экспонировали 95 дней, проявляли, затем окрашивали метиловым зеленым с пиронином, чтобы сделать видимыми ядра. Высокая концентрация зерен над ядрами показывает, что бóльшая часть кортикостерона находится в ядрах. Кроме того, зерна находятся и между ядрами. Чтобы определить, происходят ли они от ^{3}H или причиной их служит фон, необходимо выяснить число зерен на единицу площади эмульсии в месте, далеком от среза ткани. (*Stumpf W. E., Sar M.*, in "Methods in Enzymology", vol. 36, edited by B. W. O'Malley and J. G. Hardman, Academic Press, 1975.) *В* — авторадиографическое определение синтеза ДНК в клетках животных. Клетки почки африканской зеленой обезьяны выращивали в течение 6 ч в питательной среде, содержащей ^{3}H-тимидин. Затем клетки отмывали, обезвоживали и покрывали авторадиографической пленкой. После экспонирования и проявления пленки ядра (серые участки) были окрашены. Такой эксперимент позволил установить, что репликация ДНК в данных клетках проходит в течение 6 ч (период, за который ядра покрываются зернами). Следовательно, так можно измерять долю реплицирующих клеток. (Любезно предоставил Джеймс А. Робб.)

тип детекторов представляет собой относительно толстый (250 мкм) слой эмульсии, нанесенный на предметное стекло микроскопа. Жидкий эмульсионный детектор — это гель, который готовят так: образец погружают в расплавленный гель и извле-

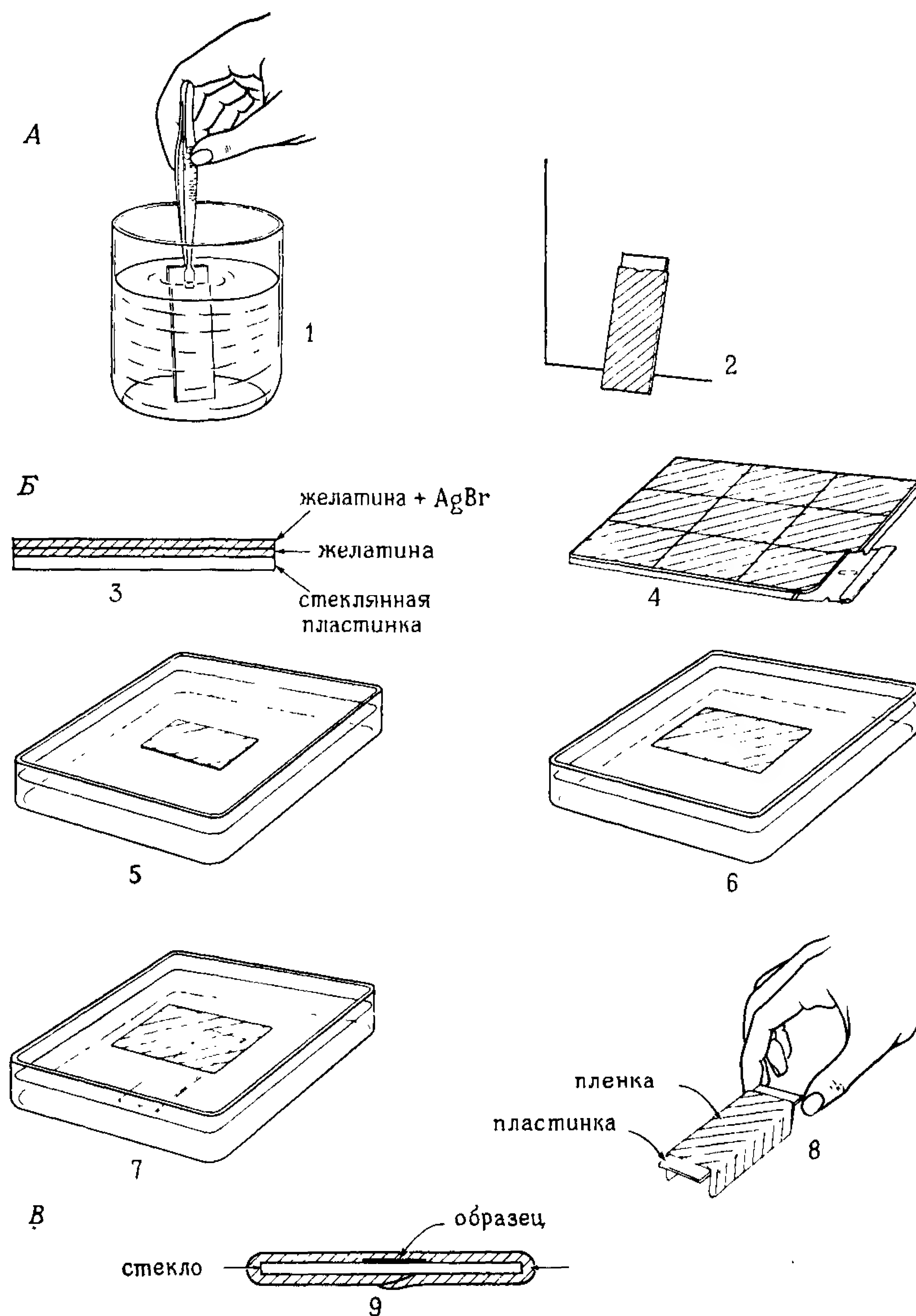


РИС. 6-2.

Методы нанесения эмульсии на образец.

А — метод погружения. Предметное стекло микроскопа с нанесенным образцом погружается в расплавленную эмульсию. Тонкий слой покрывает стекло и застывает при комнатной температуре; *Б* — метод покрывающей пленки. Готовые стеклянные пластинки с нанесенной на них пленкой размечают лезвием бритвы на прямоугольники размерами приблизительно 25×75 мм. Пленку снимают с пластинок тем же лезвием, вводя его под пленку. Пленку переворачивают, помещают на поверхность воды и поднимают, как показано на рисунке; *В* — поперечный разрез готовой пластинки с образцом и эмульсией, изготовленной методом покрывающей пленки. *1* — погружение пластинки в эмульсию; *2* — сушка; *3* — поперечный разрез пленки; *4* — удаление пленки с пластинки; *5* — пленку поворачивают лицевой стороной вниз и помещают на поверхность воды; *6* — пленку оставляют набухать; *7* — пластинку с образцом вводят под пленку, находящуюся на поверхности воды; *8* — подъем; *9* — поперечный разрез готовой пластинки.

кают, эмульсия затвердевает и образует пленку, толщина которой зависит от концентрации желатины в жидкости. Покрывающий эмульсионный детектор — это тонкая (около 5 мкм) пленка, нанесенная на стекло. Ее отделяют от стекла ножом и помещают на поверхность воды. Образец, предварительно нанесенный на предметное стекло микроскопа, помещают под плавающую пленку и поднимают вместе с ней, нанося таким образом эмульсионную пленку на стекло микроскопа. После сушки эмульсия тонким слоем плотно покрывает стекло. Эта операция показана постадийно на рис. 6-2.

Изотопы, обычно используемые в биологических и биохимических исследованиях

Чаще всего используют радиоактивные изотопы с тремя типами энергий: высокой (например, ^{32}P), средней (например, ^{14}C и ^{35}S) и низкой (например, ^{3}H). Почти все они являются β-излучателями. Иногда применяют и α-излучатели, такие, как полоний или торий. Авторадиографические свойства этих изотопов будут обсуждаться в следующем разделе.

Длина трека различных излучаемых частиц

При прохождении излучаемой источником частицы через ядерную эмульсию она постепенно теряет энергию в результате взаимодействия с ядрами и орбитальными электронами. Часть этой энергии приводит к возникновению дефектов в кристаллах галогенида серебра, вследствие чего они приобретают способность к проявлению (т. е. они становятся экспонированными). Наблюдаемое распределение проявленных зерен называется *треком,* который характеризуется тремя параметрами — длиной, плотностью зерен (либо число зерен на единицу длины, либо число зерен на общую длину трека) и формой (например, линейной, кривой, ломаной и т. д.). Эти параметры определяются массой частицы, ее энергией, свойствами эмульсии и способом ее проявления. Ниже будет обсуждаться зависимость от массы и энергии.

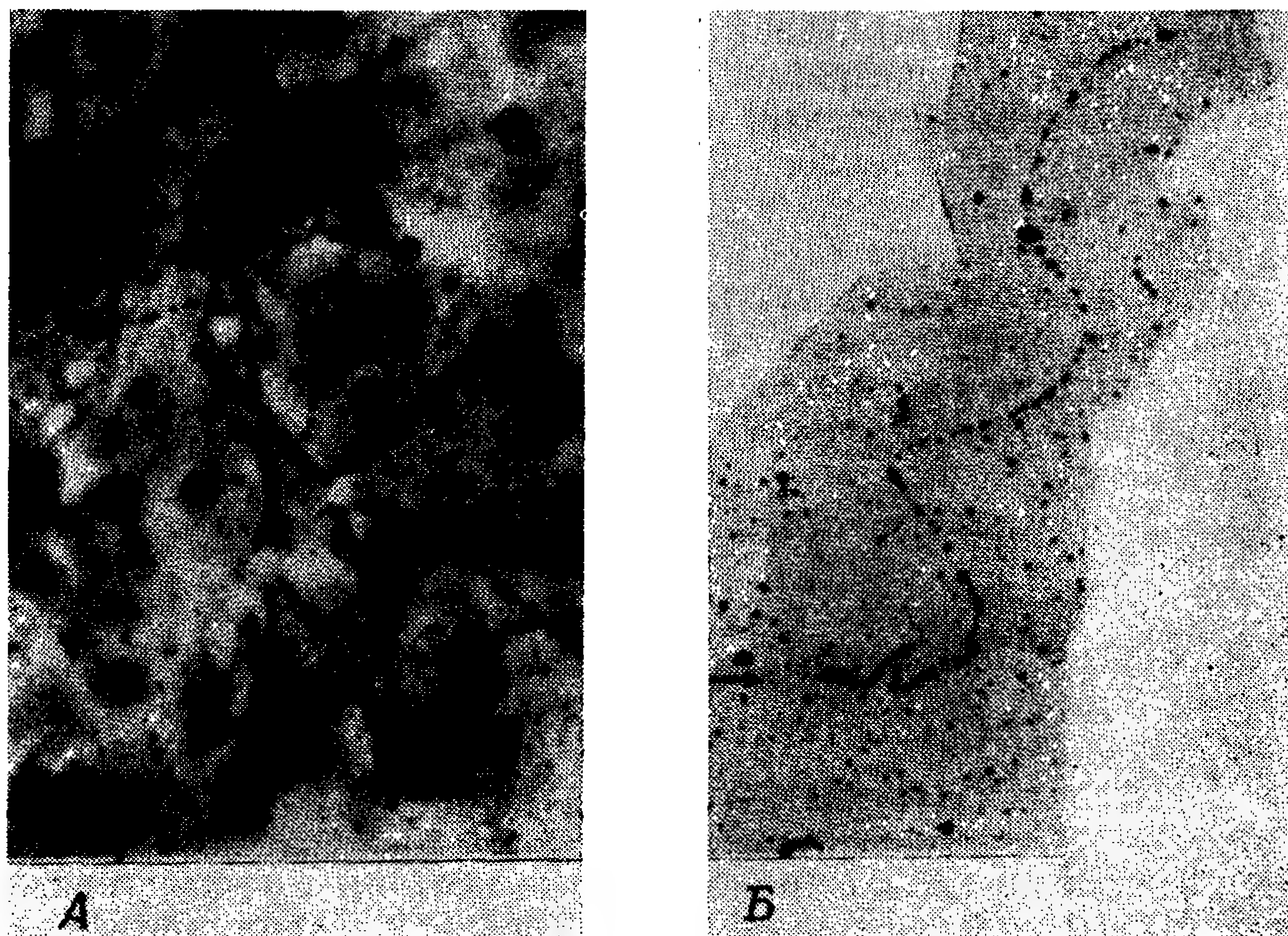


РИС. 6-3.

А — треки α-частиц, излучаемых торотрастом (двуокись тория) в тонком срезе селезенки кролика. Срез был покрыт жидкой эмульсией, которая затем затвердевала. После экспонирования эмульсию проявляли, а ядра окрашивали. Отметим высокую плотность зерен и прямизну треков и сравним их с частью *Б*. Треки имеют длину от 40 до 45 мкм. (Авторадиограмму предоставила Хильда Леви.) *Б* — трек β-частицы с энергией 300 кэВ (средняя энергия), показывающий, что плотность зерен увеличивается в конце трека (отмечен стрелкой). Длина трека приблизительно 250 мкм (*Herz R. H.*, Photographic Action of Ionizing Radiations, Wiley-Interscience, 1969).

α-Частицы

α-Частицы имеют большую массу и два положительных заряда; обычно они обладают энергией от 4 до 8 МэВ *. Эти массивные частицы обычно малочувствительны к взаимодействиям с электронами, стремятся сохранить прямое направление движения после такого взаимодействия и обладают ярко выраженной способностью выбивать орбитальные электроны при прохождении через эмульсию. Это приводит к возбуждению практически всех

* Энергию испускаемых частиц измеряют в электронвольтах — это энергия, равная необходимой для переноса электрона против разности потенциалов в 1 В или $1{,}602\cdot10^{-19}$ Дж. Обычно используют единицы и кэВ и Мэв, равные соответственно 10^3 и 10^6 эВ.

кристаллов галогенида серебра, встречающихся на пути частицы; в результате образуются треки с очень высокой плотностью зерен. Поскольку α-частица взаимодействует с огромным числом орбитальных электронов, энергия ее быстро теряется, чем и обусловлена относительно малая длина трека (обычно от 5 до 40 мкм). Фотография треков α-частиц в толстой эмульсии представлена на рис. 6-3, *А*.

β-Частицы

β-Частицы являются электронами и поэтому легко рассеиваются орбитальными электронами. При взаимодействии β-частицы с другими электронами она быстро теряет энергию и резко изменяет направление движения в результате каждого взаимодействия. Величина изменения направления зависит от энергии частицы; при очень большой энергии импульс настолько велик, что частица имеет выраженную тенденцию к движению по прямой и отклоняется в минимальной степени. Следовательно, в связи с тем что энергия теряется при каждом взаимодействии с орбитальным электроном, вероятность изменения направления движения при каждом последующем взаимодействии возрастает. Отсюда, так как энергия частицы постоянно понижается, столкновения с другими электронами приводят к тому, что путь частицы становится все более замысловатым. С другой стороны, поскольку электронная плотность в веществе очень велика, эти резкие изменения направления движения взаимно компенсируются, так что на коротком расстоянии трек остается практически прямым (изредка β-частица проходит достаточно близко от ядра, при этом она под действием поля ядра изменяет направление движения). Плотность зерен (мера числа взаимодействий на единицу длины *видимого* пути) увеличивается с потерей частицей энергии, т. е. плотность зерен всегда будет большей в конце трека, чем в его начале (рис. 6-3, *Б*); на этом основано определение направления движения частицы в эмульсии.

Все сказанное выше относится и к α-трекам, где плотность зерен также увеличивается к концу трека. Принципиальное различие между α- и β-треками состоит в том, что заряд и большая масса α-частицы приводит к взаимодействию с большим числом электронов на единицу длины, чем в случае β-частицы; при этом теряется много энергии на единицу длины, в результате чего α-частица имеет более короткий трек, чем β-частица с той же энергией.

Как отмечалось в гл. 5 (рис. 5-1), каждый изотоп обладает широким энергетическим спектром испускаемых β-частиц. Отсюда очевидно, что для любого изотопа будет характерен большой набор длин треков.

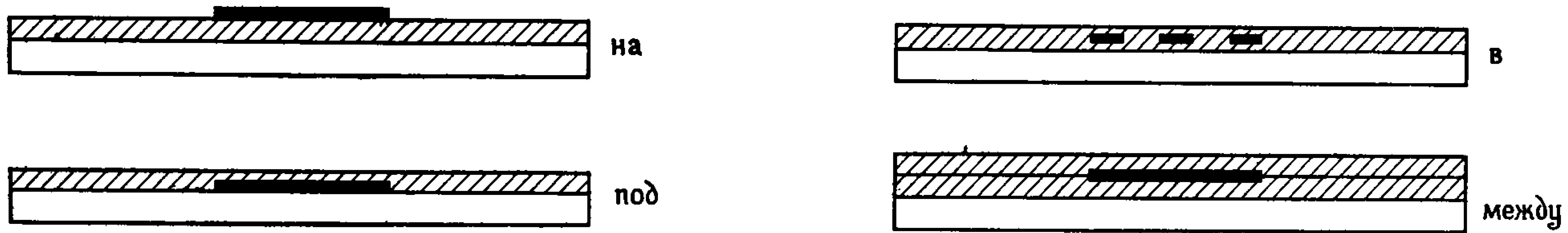


РИС. 6-4.

Четыре типа относительного расположения источника и эмульсии. Обозначение «под» соответствует покрывающей пленке или погружению. Расположение «между» применяется в случае, когда требуется очень толстый слой эмульсии.

Взаимное расположение источника излучения и эмульсии

Условимся в дальнейшем под термином *эмиттер* понимать распадающиеся ядра, а под термином *источник* — сумму потенциальных эмиттеров.

Имеются три основных типа взаимного расположения источника и эмульсии (рис. 6-4): 1) источник погружен в слой эмульсии, толщина которого превышает максимальную длину трека; 2) источник расположен на поверхности (обычно на предметном стекле микроскопа) и покрыт слоем эмульсии, толщина которого больше максимальной длины трека; 3) источник расположен на поверхности, и толщина слоя эмульсии намного меньше максимальной длины трека. В первом и втором вариантах можно наблюдать всю длину трека, хотя во втором видна только половина всех треков (другая половина никогда не попадает в эмульсию). В третьем варианте видно только начало трека. Ниже мы увидим, что эти три типа находят различное применение.

На рис. 6-5 схематически показаны треки частиц с низкой, средней и высокой энергией для каждого из трех вариантов приготовления образцов. Обратите внимание на существенные различия.

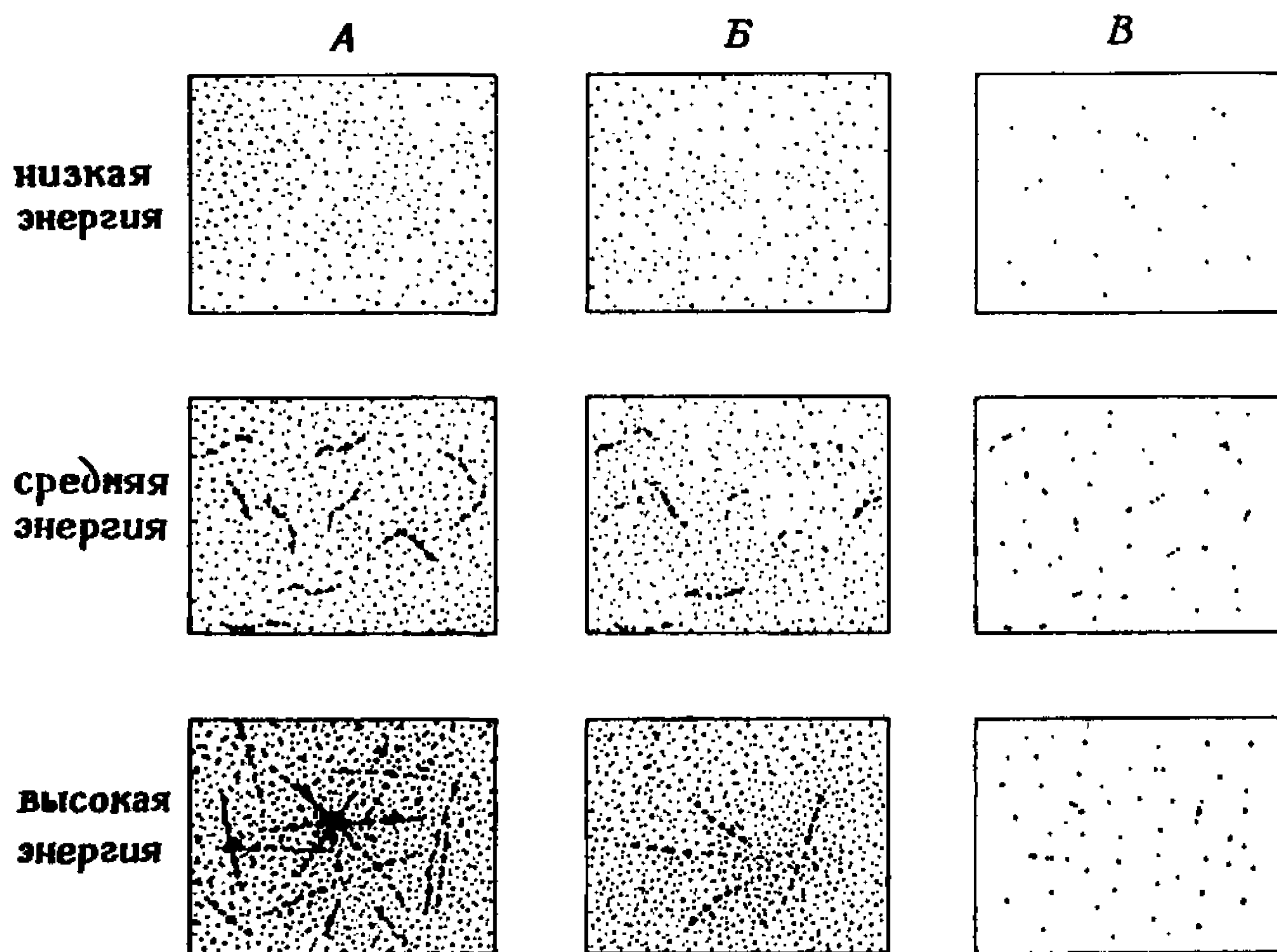


РИС. 6-5.

Вид треков β-частиц с низкой (^{3}H), средней (^{14}C) и высокой (^{32}P) энергией *в* толстом слое эмульсии, *на* толстом и *на* тонком слоях.

Обратите внимание, что треки β-частиц с высокой энергией на тонкой эмульсии превращаются в точки, а треки β-частиц с низкой энергией полностью теряются в фоне при использовании толстого слоя эмульсии. *А* — эмиттер в толстом слое; *Б* — эмиттер на поверхности толстого слоя эмульсии; *В* — эмиттер на поверхности такой эмульсии.

Факторы, влияющие на выбор изотопа и соотношение эмиттер—эмульсия

В любом эксперименте желательно получить высокое разрешение, высокую эффективность и низкий уровень фона. В этом разделе обсуждаются способы, с помощью которых это достигается.

Разрешение

Разрешение может означать возможность определения положения источника излучения, возможность различения индивидуальных зерен с целью точного счета зерен, возможность различения двух источников излучения и т. д. В первую очередь обсудим две первые возможности.

На разрешение влияет тип изотопа. При увеличении энергии эмиттера треки становятся длиннее с меньшим числом зерен вблизи точки излучения (рис. 6-5). При этом уменьшается способность локализовать эту точку, так как зерна в области низкой плотности вблизи источника становится трудно отличить от зерен фона. Следовательно, изотопы, дающие искривленные треки (например, ^{14}C), нельзя использовать для локализации источника с хорошим разрешением. Если энергия достаточно велика для того, чтобы треки были длинными и прямыми, как в случае ^{32}P, разрешение улучшается при достаточно большой удельной активности источника, позволяющей получить множество треков. В этом случае треки легко экстраполируются, давая хорошо определяемую точку, в которой они берут начало. Это детально будет описано в примере 6-А.

Если источник имеет большой объем или расположен далеко от эмульсии (вместо того, чтобы находиться с ней в прямом контакте), разрешение будет хуже, так как зерна будут находиться далеко от источника.

Размер зерен также существенно влияет на разрешение, поскольку единичное зерно может быть экспонировано за счет взаимодействия с чем-либо внутри кристалла. Поэтому у больших зерен центр может находиться на значительном расстоянии от пути частицы, что приводит к ухудшению разрешения при локализации источника. Более того, если источник представляет собой набор эмиттеров, расположенных очень близко друг к другу и являющихся изотопами, распад которых может привести к экспонированию только одного зерна (например, ^{3}H), счет распадов (в данном случае определение числа эмиттеров) по каждому зерну может быть точным только в том случае, когда размер зерен достаточно мал, чтобы их можно было отличить от

неэкспонированных. Следовательно, если размер зерна велик (больше, чем расстояние между эмиттерами), нарушается равенство между числом распадов и числом зерен.

На разрешение влияет и чувствительность эмульсии, т. е. энергия, необходимая для активации кристалла. Это легко понять, если вспомнить, что плотность зерна всегда больше в конце трека, чем в его начале, поскольку на единицу длины теряется бóльшая энергия при меньшей энергии частицы. Отсюда, если эмульсия требует значительной потери энергии для экспонирования зерна, то частицы с большой энергией не будут экспонировать зерна, пока не достигнут конца трека. Это выражается в отсутствии зерен вблизи источника и соответствующем увеличении их числа вдали от источника, что уменьшает разрешение.

Эффективность

В идеале каждый распад должен давать трек. Однако, поскольку частица сначала должна достигнуть эмульсии, трек возникает не всегда. Здесь существуют две основные проблемы: первая состоит в том, что в случае образца на поверхности эмульсии только половина излучаемых частиц будет попадать в эмульсию, а вторая связана с тем, что даже если образец погружен в эмульсию, происходит самопоглощение энергии самим образцом из-за того, что он имеет вполне определенную толщину. Для изотопов с высокой энергией, таких, как ^{32}P, самопоглощение не создает серьезных затруднений; например, образец толщиной 5 мкм (обычно максимальная толщина для большинства клеток или срезов тканей) поглощает менее 1% энергии. Для изотопов с меньшей энергией, таких, как ^{14}C и ^{35}S, через слои толщиной 5 и 10 мкм проходит 82 и 70% энергии частиц соответственно. Для изотопов с низкой энергией, таких, как ^{3}H, самопоглощение существенно: при 0,5 мкм эффективность составляет только 16%, а при 5 мкм — 4%. В мелких клетках, например в бактериальных, ^{3}H может быть определен с эффективностью 27%.

Поскольку большинство зерен образуется ближе к концу трека, эффективность зависит также и от толщины эмульсии. Действительно, в случае ^{32}P существует прямая зависимость между эффективностью и толщиной эмульсии вплоть до толщины 50—100 мкм. Для ^{14}C максимальная эффективность достигается при толщине эмульсии 3—5 мкм. Поскольку β-частицы ^{3}H имеют пробег только $\sim$1 мкм, при использовании более толстых эмульсий ничего не меняется (в действительности могут возникать осложнения за счет увеличения фона).

Фон

Проявленные эмульсии, которые не были экспонированы радиоактивным образцом, содержат темные зерна, называемые *фоном*. Каким же образом идентифицировать трек в их присутствии? Для изотопов с высокой энергией это делается легко, так как зерна треков достаточно плотны. Для ^{14}C плотность зерен в треках варьирует от высокой до низкой. У специалистов в области авторадиографии принято считать, что требуется минимум четыре зерна на прямой линии, чтобы определить трек, поскольку такая комбинация крайне маловероятна в неэкспонированной эмульсии. Однако в случае ^{3}H трек обычно представляет собой одно большое зерно, поэтому необходимо понизить фон до очень малого уровня, для того чтобы получить возможность использовать этот изотоп.

Фон может быть обусловлен множеством причин: случайным попаданием света, присутствием в образце некоторых соединений и ионов металлов (особенно Cu), механическим воздействием (легкое давление на непроявленную эмульсию вызывает сильное потемнение при проявлении), некоторыми условиями проявления, электрическими разрядами и фоновой радиоактивностью (например, ^{40}K в стекле, ^{14}C в желатине и космическими лучами). Имеется два вида фона — длинные треки и индивидуальные зерна. Длинные треки появляются большей частью в толстых эмульсиях. Для индивидуальных фоновых зерен плотность зерен (т. е. число зерен в единице объема) постоянна, а число зерен на единицу площади увеличивается с увеличением толщины эмульсии. В связи с этим крайне невыгодно применять эмульсию, толщина которой больше, чем необходимо для достижения максимальной эффективности; более того, часто бывает полезно пожертвовать эффективностью и использовать очень тонкие эмульсии для увеличения способности распознать треки — этим приемом обычно пользуются в случае ^{3}H.

Фон может появляться до внесения образца или во время экспонирования (т. е. во время между введением образца в контакт с эмульсией и проявлением) и проявления. Основной фон в виде треков легко устранить, если использовать жидкие эмульсии (см. разд. «Метод погружения»), поскольку треки (но не индивидуальные зерна) разрушаются при плавлении эмульсии. Основной фон в случае покрывающих пленок (см. следующий раздел) понижается вследствие того, что пленка содержит скрытый гаситель изображения (вещество, делающее эффект экспонирования зерен обратимым), который удаляется за время контакта с образцом, поскольку гаситель растворяется в воде, используемой для смачивания пленки. Фон, возникающий после

приложения образца, обычно сводится к минимуму скрупулезной аккуратностью и точным соблюдением правил хранения и проявления.

Методики осуществления контакта между эмульсией и образцом

Метод временного контакта

Образец вводится в соприкосновение с эмульсией, удерживается на месте в течение экспозиции с помощью давления и удаляется перед проявлением. Между образцом и эмульсией можно поме-

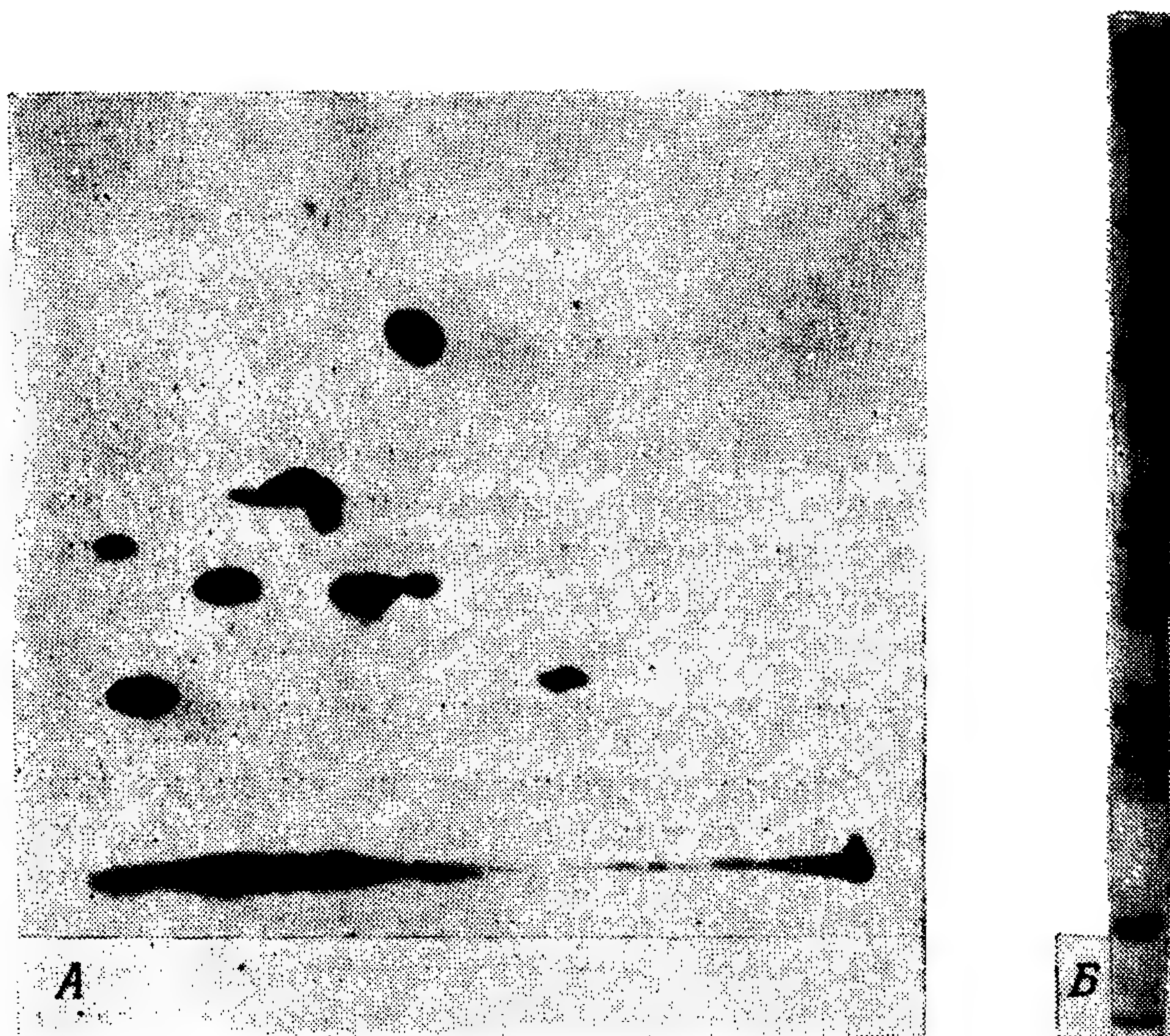


РИС. 6-6.

А — авторадиограмма двумерной хроматограммы—электрофореграммы. Главную субъединицу вируса полиомы иодировали ^{125}I (эта реакция идет исключительно по остаткам тирозина) и затем подвергали действию трипсина. Продукты ферментативного гидролиза наносили на бумагу, хроматографировали и затем подвергали электрофорезу в направлении, перпендикулярном хроматографии. Бумагу высушивали и вводили в контакт с рентгеновской пленкой. Темные пятна на пленке соответствуют положениям пептидов, содержащих остатки тирозина (предоставил Уильям Мураками). *Б* — авторадиографическое определение зон на гель-электрофореграмме белков, содержащих ^{3}H-лейцин. (Предоставил Юнко Хосода.)

стить тонкий защитный слой, чтобы предотвратить экспонирование за счет химически активных соединений в образце. Этот метод используется для идентификации пятен на хроматограммах и зон при электрофорезе в геле, а также при необходимости локализовать радиоактивные препараты в больших биологических объектах, таких, как листья, срезы костей и крупные срезы тканей. В качестве эмульсионного детектора здесь обычно применяют рентгеновскую пленку. При соблюдении некоторых условий метод позволяет получить полуколичественную информацию. Однако, поскольку зерна не могут быть экспонированы дважды, необходимо, чтобы экспонирование проводилось таким образом, чтобы почернение пленки было пропорционально количеству радиоактивности; если экспонирование ведется до тех пор, пока не проявятся области с очень малой активностью, области с высокой активностью могут выйти за пределы линейной зависимости почернения пленки от экспонируемой радиоактивности. Два примера использования этого метода показны на рис. 6-6. Заметим, что при работе с образцами такого типа нет необходимости использовать микроскоп, поскольку здесь не проводится подсчета зерен или треков.

Метод постоянного контакта

Обычно используют три варианта метода постоянного контакта: нанесение на предварительно подготовленную эмульсию, покрывание предварительно расплавленной эмульсией или погружение в нее и использование покрывающей пленки.

Нанесение на предварительно подготовленную эмульсию

В этом варианте каплю образца высушивают на эмульсии или срез ткани смачивают водой и эмульсию (нанесенную на стеклянную пластину) вводят под него таким образом, чтобы ткань лежала на эмульсии. Этот очень простой метод имеет три недостатка: 1) проявление может оказаться неоднородным, так как проявитель должен проникать через образец, 2) зерна и треки должны быть видны сквозь образец и 3) для такой эмульсии характерен высокий уровень фона. С другой стороны, этот вариант отличает высокая чувствительность. Если образец состоит из радиоактивных частиц, которые можно разбавить так, что разрешение перестает быть проблемой, и целью авторадиографии является подсчет частиц, метод дает прекрасные результаты. Чувствительность здесь можно увеличить вдвое, если покрыть нанесенный образец сверху дополнительным слоем жидкой эмульсии. Рассмотрим ставший классическим эксперимент с использованием данного метода.



РИС. 6-7.

Звезда.

Бактериофаг, меченный ^{32}P, внедряли в эмульсию. Все треки β-частиц ^{32}P исходят из одной точки, что позволяет подсчитать число треков (лучей) на звезду. Подсчет всех лучей необходимо проводить с помощью микроскопа, смещая фокус вверх и вниз, чтобы заметить те, которые находятся не в одной плоскости с источником. (Любезно предоставил Чарльз А. Томас.)

Пример 6-А. *Определение числа молекул ДНК в бактериофаге — так называемый эксперимент «звезда».* ДНК бактериофага Т2 *Escherichia coli* метили ^{32}P до очень высокой радиоактивности — приблизительно 100 атомов ^{32}P на фаг. Затем из части фагов экстрагировали ДНК и на эмульсию наносили два образца: 1) аликвоту, содержащую некоторое количество фаговых частиц, и 2) аликвоту, содержащую ДНК, выделенную из того же количества фагов. Затем образцы заливали сверху жидкой эмульсией таким образом, что они оказывались погруженными в эмульсию. После экспонирования и проявления в эмульсии наблюдали плотные треки, выходящие из одной точки (рис. 6-7). Они представляют собой следы β-частиц ^{32}P, излучаемых единичной фаговой частицей или молекулой ДНК. Их расположение носит название «звезды». При этом было найдено, что среднее число звезд на

каплю одно и то же для ДНК и фага, откуда следует предположение, что на молекулу фага приходится только одна молекула ДНК. Если бы в фаге имелось две молекулы ДНК равного размера, то число звезд в образце ДНК было бы двойным по сравнению с образцом фага. Однако, если бы фаговая частица включала бы в себя, например, одну молекулу ДНК, соответствующую 80% ДНК фаговой частицы, и десять других молекул ДНК, соответствующих каждая 2% ДНК фаговых частиц, то короткие ДНК не давали бы звезд (их нельзя было бы распознать, поскольку они редко давали бы более чем один трек) и число звезд в фаговых частицах и свободных ДНК было бы одинаковым. Однако было подсчитано число лучей (треков) на звезду, оказавшееся одним и тем же для ДНК и для фага. Следовательно, как ДНК, так и фаг содержали одно и то же число атомов ^{32}P, откуда следует, что в фаге была только одна молекула ДНК. Конечно, в таком эксперименте потребовалось определить число лучей на звезду с большой статистической точностью, с тем чтобы можно было надежно отличить 80% от 100%.

Метод погружения

Образец наносят на предметное стекло микроскопа и погружают вместе с ним в расплавленную эмульсию (рис. 6-2). Этот метод дает возможность осуществить наиболее тесный контакт между образцом и эмульсией, что приводит к максимальной эффективности при работе с эмиттерами, обладающими низкой энергией. К достоинству метода следует отнести возможность получения очень тонкой эмульсии при соответствующем разбавлении и выборе температуры; при этом подготовка образца отличается быстротой и простотой, и жидкая эмульсия позволяет получить зерна галогенида серебра с минимальным размером, что приводит к увеличению разрешения отдельных зерен. Недостатками метода являются неравномерная толщина эмульсии, но это не сказывается при использовании ^{3}H, поскольку, как было показано ранее, β-частицы ^{3}H редко проникают в кристаллы глубже чем на 1 мкм.

Способность метода погружения разрешать отдельные β-частицы от ^{3}H замечательна. Отсюда следует применение метода для определения относительного количества ДНК (по ^{3}H-тимидину) в клетках, растущих в различных условиях. Это показано в следующем примере.

Пример 6-Б. *Демонстрация того, что аминокислотное голодание предотвращает реинициацию цикла синтеза ДНК в бактерии.* Если штамм бактерии *E. coli*, требующий для роста тимин и лейцин, растет в среде, которая содержит ^{3}H-тимидин (^{3}H-dT), яв-

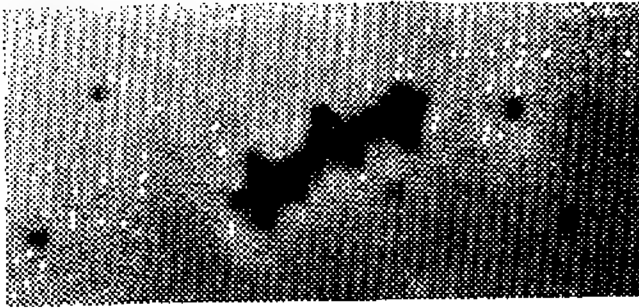


РИС. 6-8.

Авторадиограмма бактерии, меченной ^{3}H-тимидином.

Каждое зерно отражает распад одного ядра ^{3}H. Бактерия и зерна находятся в образце на разных уровнях, что затрудняет одновременное фокусирование микроскопа на клетках и зернах. На рисунке в фокусе находятся зерна, поэтому бактерия выглядит расплывчатой. (Любезно предоставил Уильям Хоув.)

ляющийся предшественником ДНК, и аминокислоту лейцин, ^{3}H-dT включается в ДНК в процессе репликации. Если из среды удалить лейцин, включение ^{3}H-dT будет продолжаться в течение роста одного поколения клеток, а затем прекратится. Количество ДНК, синтезированное за период лейцинового голодания, точно соответствует рассчитанному для *популяции*, в которой все клетки участвовали в полном репликативном синтезе ДНК, если только репликация молекулы уже началась, но не реинициировали синтеза. Однако для подтверждения такой интерпретации необходимо показать, что распределение включения метки *на клетку* согласуется с предположенным распределением индивидуальных клеток по возрасту, поскольку существует возможность, что такое распределение может быть достаточно разнообразным — например, большинство клеток может не синтезировать ДНК, тогда как оставшиеся немногие клетки производят более чем одну копию и совпадение может оказаться случайным.

Для проверки этого культуру бактерии разделяли на две части. Одну выращивали в среде, содержащей ^{3}H-dT и лейцин на протяжении многих поколений; другую выращивали с нерадиоактивными тимидином и лейцином в течение многих поколений, а затем заменяли среду на содержащую H^3-dT, но без лейцина, и продолжали культивирование до прекращения включения ^{3}H-dT. Разбавленные аликвоты каждой культуры наносили на предметные стекла микроскопа, высушивали и подготавливали для авторадиографии методом погружения. После экспонирования в течение нескольких дней и проявления пластинки с клетками и эмульсией погружали в раствор клеточного красителя, чтобы сделать бактерию видимой под микроскопом. На рис. 6-8 показана окрашенная клетка с зернами ^{3}H. Количество клеток с 0, 1, 2, 3, ... зернами сводят в таблицу. Первая культура давала данные по распределению зерен на клетку, характерному для полного комплементарного синтеза ДНК. Вторая культура давала данные о количестве ДНК, синтезированной в каждой клетке только за

время лейцинового голодания. Статистический анализ распределения, полученный для этой культуры, соответствовал приведенной выше интерпретации. Этот эксперимент подтвердил важную гипотезу, согласно которой для инициации синтеза ДНК необходим синтез белка.

Метод покрывающей пленки

Покрывающая пленка состоит из слоя ядерной эмульсии толщиной 5 мкм на подложке из желатины толщиной 10 мкм, нанесенной на стеклянную пластинку. Ее можно отделить от стекла скальпелем. Метод состоит в том, что пленку помещают эмульсией на поверхность воды, выдерживают 2—3 мин, после чего ее площадь становится равной 140% от первоначальной. Стеклянную пластинку с образцом вводят под плавающую на воде пленку и поднимают таким образом, чтобы пленка облегала ее. После высушивания пленка уменьшается в размере и плотно обтягивает пластинку (рис. 6-2). Как эмульсия, так и желатина остаются в тесном контакте с образцом в течение экспонирования, проявления и наблюдения с помощью микроскопа. После проявления образец обычно окрашивают, чтобы сделать его видимым.

Покрывающая пленка очень удобна в работе и дает высокое разрешение в пределах от 0,5 до 5,0 мкм. Толщина эмульсии здесь более равномерна, чем в других методах, что позволяет на основании счета зерен проводить достаточно точное сравнение радиоактивности различных структур или частей клеток. Однако метод имеет и некоторые недостатки: эмульсия здесь менее чувствительна, чем в других вариантах; если покрывание проводится при низкой влажности, происходит наведение статического заряда, вызывающего увеличение фона; сама процедура требует большего времени, чем метод погружения. Метод находит достаточно широкое применение в авторадиографии, хотя некоторые специалисты считают, что метод погружения обладает всеми его преимуществами плюс быстрота. Вообще можно считать, что выбор между двумя методами — погружения и покрывающей пленки — дело вкуса.

С помощью метода покрывающей пленки был проведен один из классических экспериментов в молекулярной биологии.

Пример 6-В. *Демонстрация числа сохраняющихся субъединиц хромосом.* В 1957 г. Мэтью Мезельсон и Франклин Шталь показали, что ДНК реплицируется с частичным сохранением (гл. 11, пример 11-К); таким образом, каждый тяж служит матрицей для репликации другого, так что два первоначальных тяжа разделяются на отдельные дочерние двойные спирали. Хромосомы клеток корней бобов *Vicia faba* можно пометить ^{3}H-тимидином, выращивая их продолжительное время в среде, содержащей ^{3}H-d*T*. Авто-

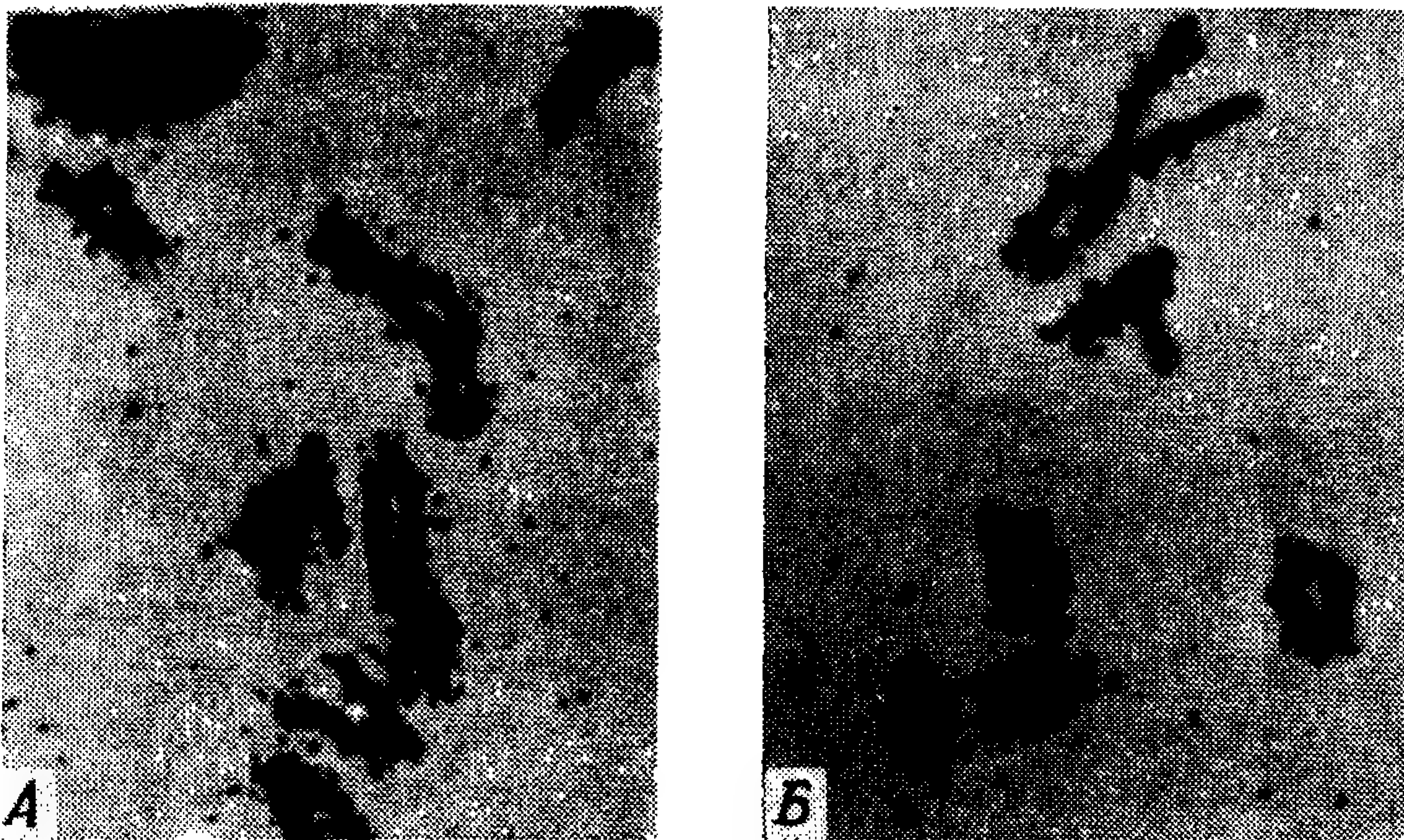


РИС. 6-9.

Авторадиограммы, показывающие хромосомы *Vicia faba* при первом (*А*) и втором (*Б*) делениях после мечения ^{3}H-тимидином в течение одной синтетической фазы.

А — метку включают обе родственные хроматиды; *Б* — меченой оказывается только одна из каждой пары. Отметим, что самая верхняя из них с X-образной конфигурацией оказывается меченой в обеих верхних ветвях, но соответственно далеко и близко от центральной точки пересечения. Это является примером родственного обмена в хроматидах (*Taylor J. Herbert*, Molecular Genetics, part-I, Academic Press, 1963). (Авторадиограммы любезно предоставил Дж. Герберт Тейлор.)

радиограммы таких клеток при митозе показывают, что все зерна локализуются над хромосомами (рис. 6-9). Если после введения метки в больших количествах продолжать выращивание клеток на нерадиоактивной среде в течение некоторого времени, авторадиограммы образцов, отбираемых через различные промежутки времени, показывают, что после одного поколения в клетках имеются при митозе дочерние хромосомы, содержащие радиоактивность, но число зерен на хромосому равно только половине такого числа для первоначальной хромосомы. После многократной смены клеток число зерен на хромосому остается постоянным и равным половине числа зерен для первоначальной хромосомы, причем две меченые парные хромосомы никогда не разделяются в течение анафазы. Таким способом Дж. Герберт Тейлор показал, что хромосомы содержат две субъединицы, которые разделяются при первом делении после синтеза и после этого сохраняются. Этот результат находится в соответствии с экспериментом Мезельсона — Шталя, если субъединицы представляют собой индивидуальные полинуклеотидные тяжи ДНК.

Молекулярная авторадиография

В принципе авторадиография служит для *локализации* радиоактивности в клетках или тканях. Однако существует возможность использовать авторадиографию для того, чтобы сделать молекулы *видимыми*, или для определения их физических параметров.

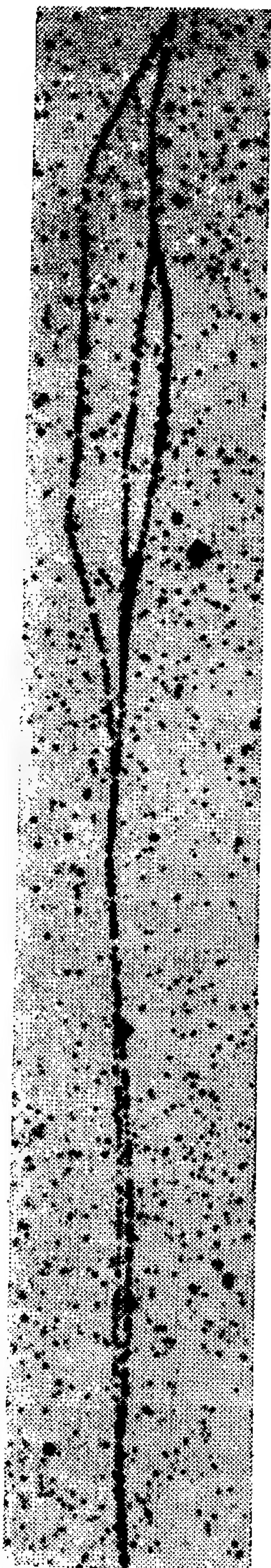


РИС. **6-10.**

Авторадиограмма реплицирующейся хромосомы *E. coli*. (Любезно предоставил Джон Кейрнс.)

В этом случае она носит название молекулярной авторадиографии. (Первый случай такого применения метода приводился в примере 6-1, где была определена молекулярная масса молекулы ДНК фага.) Этот эффективный метод не нашел широкого применения и ограничен пока рядом исследований структуры ДНК с целью получения информации, которая не может быть получена из данных других методов. Хорошо известный пример приводится ниже.

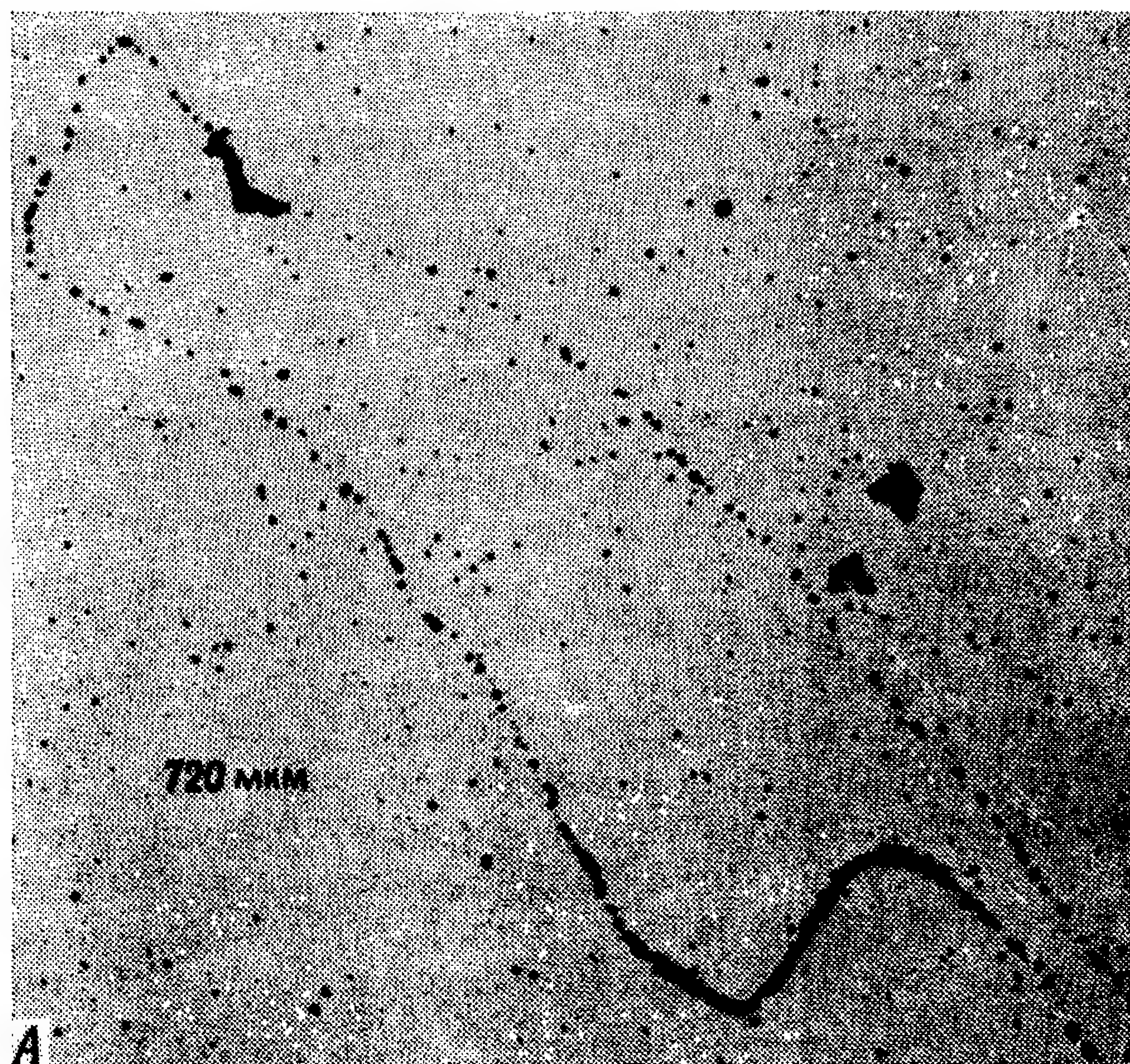
Пример 6-Г. *Наблюдение репликации молекулы ДНК E. coli.* Джон Кейрнс выращивал бактерии *E. coli* в течение многих поколений в среде, содержащей ^{3}H-dT; затем он выделял нефрагментированную ДНК, растягивал ее путем адсорбции на фильтре из нитроцеллюлозы (гл. 7) и получал авторадиограммы методом покрывающей пленки. Примеры полученных им прекрасных картин приведены на рис. 6-10. Авторадиограммы показали, что молекула ДНК *E. coli* представляет собой кольцо, и дали длину молекулы. [Хотя молекулы ДНК довольно легко можно увидеть в электронном микроскопе (гл. 13), электронная микроскопия таких больших молекул ($M = 2{,}6 \cdot 10^9$) в расправленном виде невозможна, поскольку приготовление образца для электронной микроскопии приводит к разрывам в ДНК.

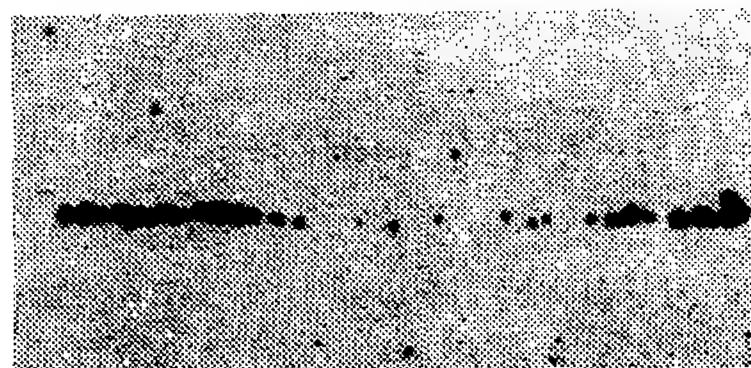
Если же условия приготовления образца позволяют избежать разрывов, молекула при этом запутывается.]

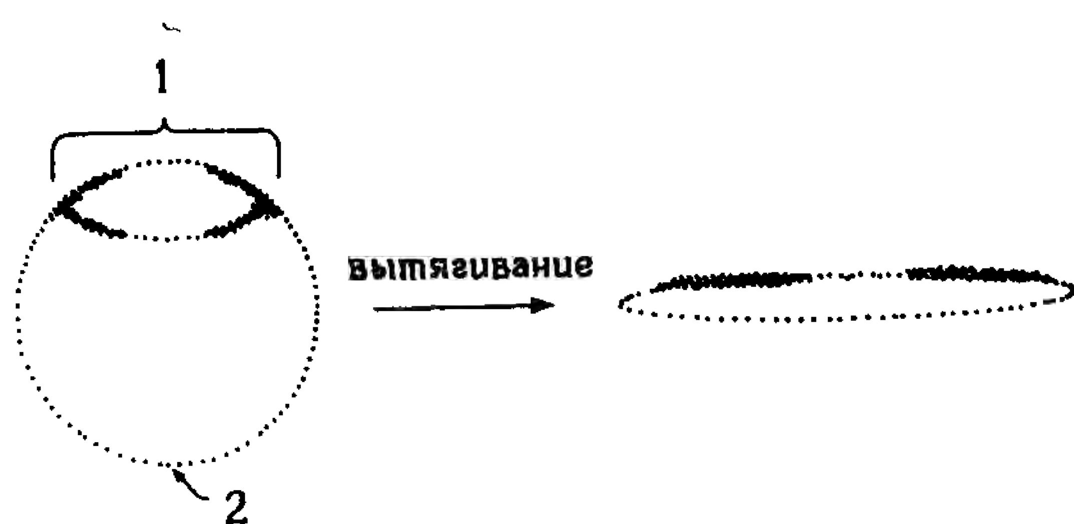
При некоторой модификации данного эксперимента можно показать, в какой части молекулы происходит репликация (эта информация необходима для построения модели репликации). Это можно сделать путем выращивания клеток за промежуток времени, немного превышающий продолжительность одной генерации, в среде, содержащей ^{3}H-dT. После одной генерации метка включается только в один тяж ДНК; однако продолжающаяся репликация в течение дополнительного короткого промежутка времени приводит к образованию коротких отрезков ДНК, *содержащих ^{3}H-dT в обоих тяжах*. Следовательно, ДНК, реплицирующаяся во второй генерации, будет иметь двойную *плотность зерен* (число зерен на единицу длины) по сравнению с остальной. Таким образом дважды реплицированная ДНК была идентифицирована авторадиографически и, как и ожидалось, она всегда соседствовала с репликативными вилками. Важным результатом явилось наблюдение двух участков с двойной плотностью зерен, присоединенных к каждой вилке. Из этого следует, что обе вилки были способны к росту, т. е. ДНК реплицируется по двум направлениям (рис. 6-11).

Авторадиография и электронная микроскопия

Обычно авторадиограммы изучают с помощью обычного микроскопа. Люсьен Каро и Роберт ван Тюберген разработали метод, позволяющий использовать электронный микроскоп с высоким разрешением. Для этого необходимо применять очень тонкий слой эмульсии, который бы не препятствовал наблюдению образца в электронный микроскоп. Тонкий срез ткани или клетку, *заделанную* в пластмассу и адсорбированную на решетке для электронного микроскопа, погружали в эмульсию, разбавленную настолько, чтобы наносился только монослой кристаллов галогенида серебра. При этом использовали очень мелкие ($<$0,1 мкм) кристаллы. После экспонирования и проявления срез ткани окрашивали уранилацетатом и изучали с помощью электронного микроскопа (рис. 6-12). Такой метод позволяет получить разрешение до 0,1 мкм. До сих пор метод использовали редко, но он явно заслуживает большего внимания.







Б

РИС. **6-11.**

А — авторадиограмма целой хромосомы *E. coli*, полученная при введении тритированного тимидина в синхронную культуру чувствительного к температуре, дефектного по инициации штамма, во время вступления в синхронный



РИС. **6-12.**

Электронная микрофотография авторадиограммы бактерии *E. coli*, меченной ^{3}H-тимидином.

Обратите внимание, что при электронной микроскопии зерна выглядят скорее как нити серебра, а не как точки. (Любезно предоставил Люсьен Каро.)

цикл репликации. Интенсивность введения метки увеличивалась к концу этого цикла репликации и оставалась на этом высоком уровне в течение времени, необходимого для инициации следующего цикла репликации. При таком подходе хуже метятся те части хромосомы, репликация которых происходит в начале и в конце цикла репликации. Если репликация идет по двум направлениям, эти две меченые области должны быть расположены симметрично на противоположных сторонах хромосомы, как в данном случае [*Rodriguez R. L., Dalbey M. S., Davern C. I.*, J. Mol. Biol., 74, 599—604 (1973)]. *Б* — другой способ наблюдения области репликации молекулы ДНК. Нерадиоактивную культуру *E. coli* выращивали в течение 10 мин в среде, содержащей ^{3}H-тимидин с низкой удельной радиоактивностью, а затем в течение 5 мин в среде с высокой удельной радиоактивностью ^{3}H-тимидина. Затем ДНК выделяли и подготавливали для авторадиографии методом, приводящим к вытягиванию. Вследствие вытягивания наблюдаемая картина является результатом суперпозиции двух цепей ДНК. Интерпретация картины показана на схеме под авторадиограммой. Тот факт, что область с низкой плотностью зерен ограничена с двух сторон двумя областями с высокой плотностью, также свидетельствует о репликации по двум направлениям [*Rodziguez R., Davern C. I.*, J. Bacteriol., in press].

1 — высокорадиоактивная область; *2* — низкорадиоактивная область.

Список литературы

Caro L., Van Tubergen R. P., High Resolution Autoradiography, J. Cell. Biol., 15. 179—188 (1962).

Использование электронной микроскопии в авторадиографии.

Gabran P. B., Autoradiography for Biologists, Academic Press, 1972.

Gude W. D., Autoradiographic Techniques: Localization of Radioisotopes in Biological Material, Prentice-Hall, 1968.

Levinthal C., Thomas C. A., Molecular Autoradiography: The β-ray Counting from Single Virus Particles and DNA Molecules in Nuclear Emulsion, Biochim. Biophys. Acta, 22, 453—465 (1957).

Задачи

6-1. После прикрепления к бактерии фаг вводит в нее всю свою ДНК. Если фаг облучить рентгеновскими лучами, он теряет жизнеспособность. Известно, что рентгеновские лучи вызывают двухнитевые разрывы в ДНК. Разработайте авторадиографическую методику, позволяющую определить, вводит ли облученный фаг всю свою ДНК или только ее фрагмент.

6-2. Фаг метили так, что он содержал 42 атома ^{32}P (в среднем) на фаг. Эффективность определения ^{32}P с помощью авторадиографии в толстой пленке равна 94%. Сколько дней необходимо экспонировать пленку, чтобы получить в среднем 12 лучей на звезду?

6-3. Предположим вы подозреваете, что большая клетка (диаметром 50 мкм) включает некое соединение только в клеточную стенку, а другие исследователи утверждают, что включение происходит только в цитоплазму. Можно ли эти две альтернативы различить с помощью авторадиографии и как?

6-4. Известно, что штамм *E. coli* имеет четыре полные хромосомы, если он растет на определенной богатой среде. Как это можно установить с использованием авторадиографии? (Укажем, что клетку можно оставить делиться с образованием микроколонии на агаре, где будет присутствовать только несколько сот клеток.)

6-5. Вы хотите идентифицировать радиоактивные пятна на хроматограмме на бумаге путем контакта с рентгеновской пленкой. В вашем распоряжении имеются ^{3}H и ^{14}C. Какой изотоп вы будете использовать и почему?

6-6. Мутантная бактерия обладает свойством синтезировать белок при 42°C со скоростью, составляющей $^{1}/_{10}$ от скорости синтеза при 37°C. Разработайте авторадиографический эксперимент, чтобы определить, все ли бактерии в популяции обладают таким свойством или внутри популяции существуют фракции с нормальными и аномальными свойствами. Укажите, какие биохимические препараты, изотопы и эмульсию вы будете использовать. Почему будет необходимо различное время экспонирования для контрольной и мутантной популяции?

6-7. Странный мутант *E. coli* обладает свойством асимметрического деления с образованием нормальной клетки и аномальной, составляющей $^{1}/_{10}$ объема нормальной с исключительно высокой частотой. Маленькие клетки никогда далее не делятся. Как можно определить, обладают ли они нормальным количеством ДНК или РНК?

6-8. Нуклеоли являются плотными телами в ядрах многих клеток эукариотов; в клетках животных их диаметр составляет $^{1}/_{10}$ размера ядра. Можно ли с помощью авторадиографии определить, содержат ли они ДНК? Объясните.

6-9. Клетки мужских штаммов *E. coli* образуют пары с клетками женских штаммов с переносом ДНК от мужских к женским с образованием генетических рекомбинантов (т. е. женских клеток, которые теряют собственные гены с заменой их генами мужских клеток). Генетические тесты показывают, что рекомбинанты не образуются при смешении мужских клеток с мужскими или женских с женскими. Это может происходить либо в результате отсутствия однополового спаривания, либо при отсутствии переноса. Разработайте авторадиографический эксперимент, позволяющий установить существование спаривания клеток одного пола.

ГЛАВА 7

Мембранная фильтрация и диализ

В химии и биохимии одной из наиболее часто встречающихся операций является отделение одного вещества от другого. До введения в практику центрифугирования, электрофореза, хроматографии и других современных методов это при возможности достигалось с помощью фильтрования. Первоначально фильтром служила тонкая ткань (например, для отделения творога от сыворотки применяли марлю), и до сих пор марлю иногда используют для предварительного осветления экстрактов тканей. Позднее ткань была заменена пористой бумагой, затем были разработаны методы получения бумаги с различными размерами пор, что позволяет контролировать размер задерживаемых частиц. Чтобы задерживать частицы, которые по размеру меньше размера пор самых тонких сортов бумаги, используются фильтры на основе ацетата целлюлозы, нитроцеллюлозы и стекловолокна. Еще более тонкой мембраной служит пленка для диализа, которая пропускает *небольшие* молекулы и ионы, но задерживает *макро*молекулы и макромолекулярные ассоциаты. Вариантом диализа является так называемый молекулярный фильтр, который отделяет *малые* макромолекулы от *больших*.

Установлено, что нитроцеллюлозные мембраны обладают полезными адсорбционными свойствами (независимо от их способности к фильтрованию), благодаря которым они могут связывать определенные макромолекулы (например, одноцепочечные полинуклеотиды и некоторые белки) размером меньшие, чем размер пор фильтра; это свойство имеет большое значение для современных аналитических методов и будет подробно рассматриваться в данной главе.

Фильтры из нитроцеллюлозы и мембранная фильтрация

Фильтры из нитроцеллюлозы представляют собой тесное переплетение нитроцеллюлозных волокон*. Метод их изготовления позволяет контролировать максимальный размер частиц, прохо-

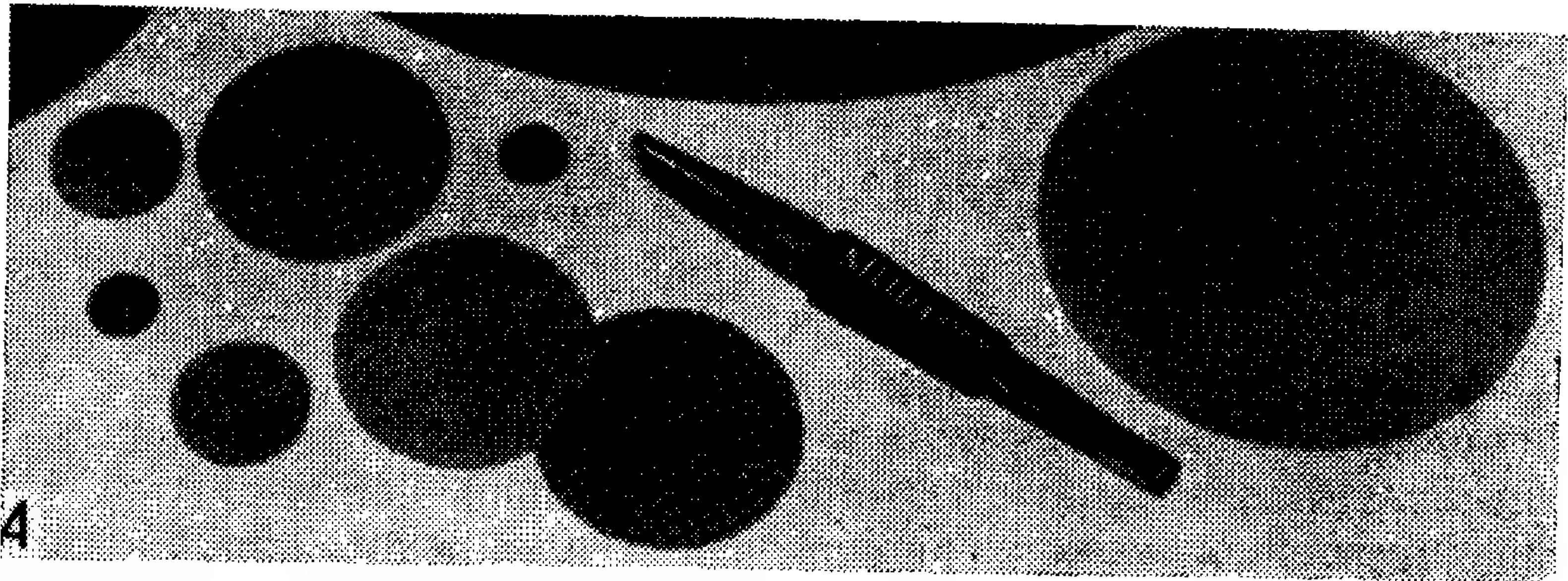
* Хотя фильтры обычно называют нитроцеллюлозными, они представляют собой смесь нитрата и ацетата целлюлозы (например, изготовляемые фирмой Millipore Corporation).

дящих через фильтр. Поры фильтра не круглые, а неправильной формы и занимают по меньшей мере 80% площади поверхности (рис. 7-1, *А—В*). Фильтры имеют достаточную толщину, чтобы удерживаемые частицы не проходили сквозь фильтр и в то же время легко смывались с поверхности. Наиболее известными фирмами, выпускающими такие фильтры, являются Millipore, Schleicher and Schuell и Gelman. Диапазон максимальных размеров частиц простирается от 0,01 до 8,0 мкм. Чаще всего используют фильтры с диаметром пор приблизительно 0,45 мкм.

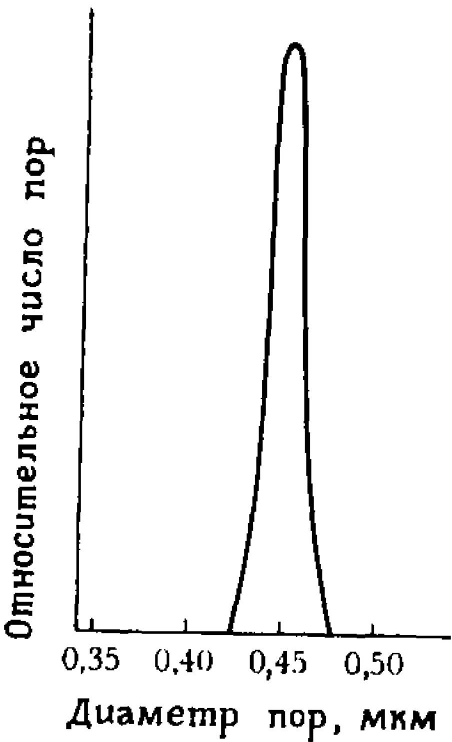
Вследствие малого размера пор и поверхностного натяжения жидкости проходят через эти фильтры с большим трудом, поэтому приходится обычно в качестве дополнительной движущей силы использовать давление или разрежение. Типичный прибор для фильтрования с разрежением изображен на рис. 7-2. При вакууме, создаваемом водоструйным насосом, скорость потока через фильтр с размером пор 0,45 мкм составляет приблизительно 65 мл·мин$^{-1}$·см$^{-2}$. Вторым следствием малого размера пор является возможность использовать фильтры только при работе с малыми количествами материала, поскольку они легко засоряются; количество материала, которое можно отделить до существенного уменьшения скорости потока, составляет приблизительно 250 мкг/см^2 поверхности. Чтобы уменьшить трудности, связанные с засорением, фильтры иногда используют в комплекте с «предварительным фильтром» из толстой бумаги или стекловолокна, служащим для удаления частиц большого размера, которые особенно легко засоряют фильтр. Однако эти фильтры прекрасно служат для отделения микроосадков.

Следует отметить два малоизвестных, но важных факта о свойствах нитроцеллюлозных фильтров. Первый — нитроцеллюлоза достаточно гидрофобна, поэтому для того, чтобы фильтры смачивались, во многие из них введен детергент или поверхностно-активное вещество, состав которого фирмой не сообщается. Второй — фильтры очень быстро становятся хрупкими при высушивании, поэтому многие из них содержат глицерин для повышения эластичности. Таким образом, если фильтры предварительно не отмыть, эти вещества могут загрязнять фильтрат, что является существенным недостатком, если при разделении нужен именно фильтрат.

Нитроцеллюлозные фильтры изготовляются в виде белых, черных или зеленых кружков или листов, на которые может быть нанесена сетка, позволяющая подсчитывать число частиц. Цвет фильтра используется для определения некоторых микроорганизмов под микроскопом. Поскольку нитроцеллюлоза растворима в ряде растворителей и способна взаимодействовать с некоторыми химическими соединениями, фирмы изготовляют также сходные


А


Б


Относительное число пор
0,35
0,40
0,45
0,50
Диаметр пор, мкм
В


Г

РИС. 7-1.

А — фотография мембранных фильтров фирмы Millipore различных размеров. На некоторых из них видна нанесенная сетка. *Б* — сканирующая электронная микрофотография фильтра фирмы Millipore, тип НА, средний размер пор которого составляет 0,45 мкм. *В* — распределение пор по размерам для фильтра, показанного на рис. *Б*. Г — сканирующая электронная микрофотография фильтра фирмы Millipore Microfiber Glass (размер изображения 20 мкм). Обратите внимание на значительно большее различие в размерах пор, чем в фильтре на рис. *Б*. (Фотографии любезно предоставлены Millipore Corporation.)

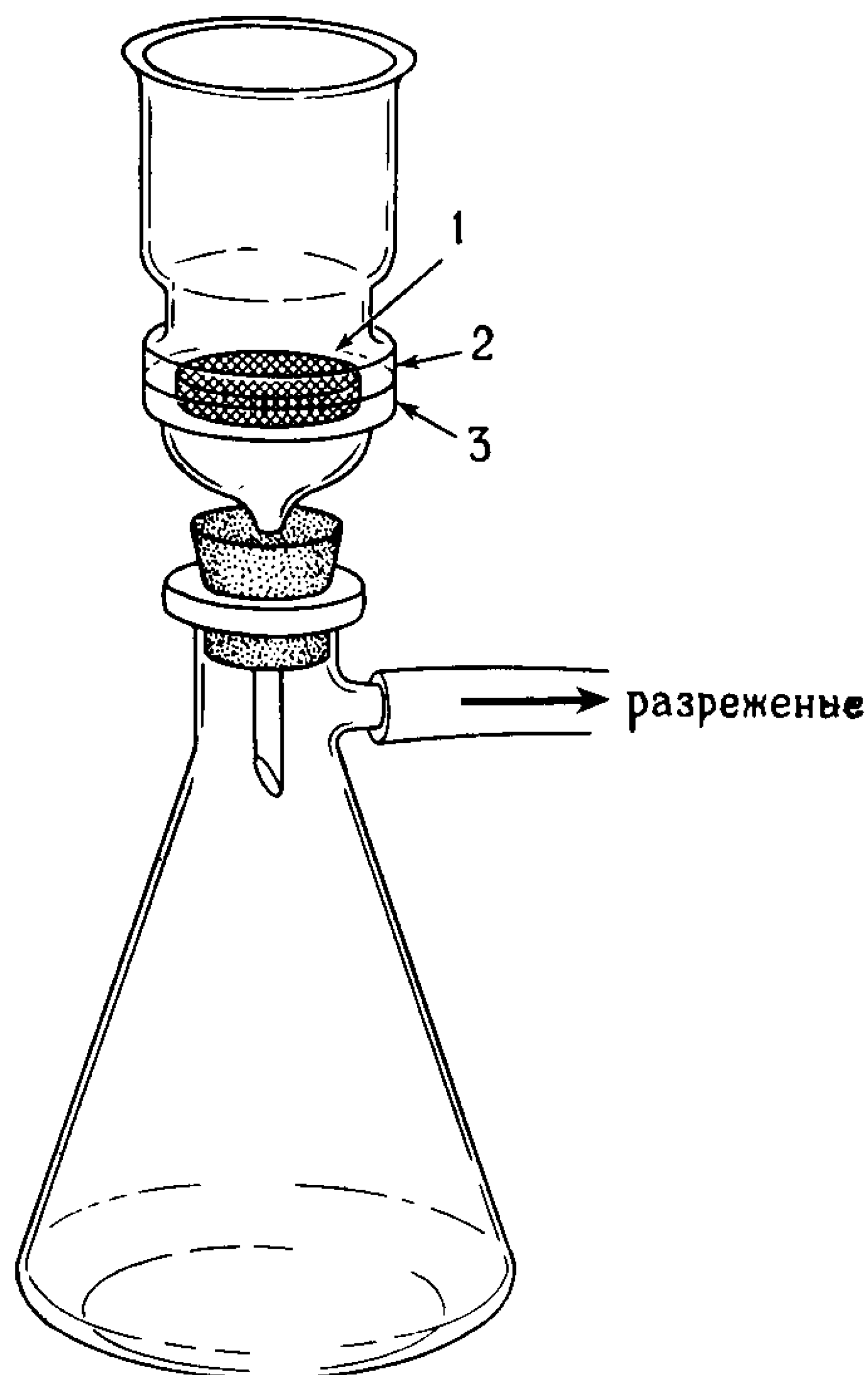


РИС. 7-2.

Типичный прибор для фильтрования с разрежением.

1 — пористая стеклянная пластинка, на которую помещают фильтр; кольца *2* и *3* сжимают пружинным зажимом.

мембранные фильтры из ацетата целлюлозы, найлона и поливинилхлорида для использования в некоторых системах растворителей.

Фильтры из стекловолокна

Фильтры из стекловолокна представляют собой переплетение тонких стеклянных волокон (рис. 7-1,*Г*). Это переплетение не может быть получено таким тесным, как в случае нитроцеллюлозных фильтров, поэтому для того, чтобы добиться прочности и способности удерживать частицы малого размера, фильтры из стекловолокна должны быть относительно толстыми — приблизительно 0,25 мм. К достоинствам фильтров из стекловолокна следует отнести очень высокую скорость протока (до 120 мл·мин$^{-1}$·см$^{-2}$), большую емкость до засорения, устойчивость практически во всех растворителях, возможность нагревания до высокой температуры для быстрой сушки и низкую стоимость (примерно одна треть стоимости мембранных фильтров на единицу поверхности). К недостаткам можно причислить возможность попадания в фильтрат мелких частиц стекловолокна, ограниченный набор диаметров пор и, поскольку мелкие частицы проникают в относительно толстый фильтр, не всегда возможно их полное удаление.

В следующем разделе будет рассмотрено применение фильтров из нитроцеллюлозы и стекловолокна, а в ряде случаев указано преимущество того или другого типа.

Фильтрация с использованием фильтров из нитроцеллюлозы и стекловолокна

Осветление растворов

В процессе различных химических и биологических операций бывает необходимо удалить определенное вещество из жидкости. Если его частицы очень малы и их не слишком много, для этой цели можно использовать фильтры из нитроцеллюлозы или стекловолокна, за исключением случая, когда частицы слишком малы, чтобы их можно было отделить на фильтре из стекловолокна. Если при этом в жидкости содержится большое количество обычных частиц, необходимо предварительное фильтрование через фильтр из стекловолокна с большими порами, чтобы избежать засорения (большинство предварителных фильтров изготовлено из стекловолокна из-за его высокой емкости).

Некоторые белки, вирусы и бактериофаги адсорбируются на нитроцеллюлозе, поэтому, если необходимо удалить большие частицы без потери подобных материалов, фильтр следует предварительно обработать. Пропускание через фильтр 0,1%-ного раствора альбумина бычьей сыворотки (АБС) в воде с последующим тщательным отмыванием его буферами с низкой ионной силой обычно приводит к насыщению центров адсорбции и предотвращает связывание других белков. Одноцепочечные полинуклеотиды связываются с фильтрами из нитроцеллюлозы и стекловолокна при средней ионной силе, поэтому их связывание не предотвращается промыванием АБС. Однако при низкой ионной силе эта проблема отпадает.

Если осветляемый раствор предназначен для изучения специальными методами, такими, как ядерный магнитный резонанс, измерение оптической плотности, флуоресценции, оптической активности, пригоден любой тип фильтра. Однако, если предполагается измерять рассеяние света или вязкость, когда необходимы растворы, абсолютно свободные от взвешенных частиц, фильтры из стекловолокна нежелательны, поскольку в фильтрат иногда могут попадать мельчайшие частицы стекла.

Отделение осадков для измерения радиоактивности

Как было описано в гл. 5, для определения радиоактивности макромолекул почти всегда необходимо предварительно отделить радиоактивные макромолекулы от малых радиоактивных молекул и сконцентрировать образец до небольшого объема, чтобы избежать разбавления сцинтиллятора или добавления воды. Обычно это производят путем осаждения хлорной или трихлоруксусной кислотой (соляную кислоту можно применять для полинуклеотидов, но она неэффективна для белков). После подкисления осадки можно быстро отделить на фильтрах из нитроцеллюлозы или стекловолокна, после чего промыть, используя прибор, показанный на рис. 7-2. Для счета жидкостным сцинтилляционным методом следует использовать стекловолокно, поскольку оно приводит к некоторому увеличению эффективности счета и может быть высушено при высокой температуре без обугливания, которое иногда вызывает световое тушение (гл. 5). При использовании счетчиков Гейгера — Мюллера оба типа фильтров эквивалентны.

Замена среды для растущих бактерий

В некоторых экспериментах с растущими бактериями иногда необходимо очень быстро сменить питательную среду, например, когда следует удалить радиоактивное соединение или определен-

ный компонент среды. Для этой цели прекрасно подходит мембранная фильтрация. При этом следует учитывать два обстоятельства: 1) нитроцеллюлозные фильтры содержат глицерин, который должен быть отмыт перед использованием (иначе он может попасть во вторую среду при смывании клеток), и 2) многие бактерии адсорбируются на нитроцеллюлозе (приблизительно $2 \cdot 10^6$ клеток/см^2), что препятствует количественному переносу при низкой плотности клеток (обычно это предотвращается обработкой фильтра 0,1% АБС — приблизительно 0,25 мл/см^2 — перед отделением клеток). После фильтрации клетки удаляются с фильтра смыванием питательным раствором или погружением фильтра в среду при осторожном перемешивании. Хотя эта методика чаще всего применяется для бактерий с использованием нитроцеллюлозных фильтров, недавно она стала применяться и для клеток животных с использованием фильтров из стекловолокна.

Нитроцеллюлозные фильтры и анализ связывания

Нитроцеллюлозные фильтры в определенных условиях способны связывать белки и одноцепочечные ДНК. Такое связывание может найти применение для большого числа ферментативных и физико-химических анализов, а также в качестве метода очистки различных препаратов. Связывающие свойства двух коммерческих нитроцеллюлозных фильтров представлены в табл. 7-1. Следует заметить, что связывание белков не зависит от ионной силы, однако одноцепочечные ДНК прочно удерживаются такими фильтрами только при относительно высокой ионной силе. Плохое связывание одноцепочечных ДНК с фильтром Millipore необъяснимо, хотя, может быть, оно обусловлено тем, что эти фильтры изготовлены не из чистой нитроцеллюлозы. РНК не связываются с этими фильтрами.

Связывающие свойства фильтров лучше всего демонстрируются приведенными ниже примерами.

Пример 7-А. *Очистка ковалентно замкнутой кольцевой ДНК.* Некоторые штаммы бактерий и ряд клеток животных содержат ковалентно замкнутую кольцевую двухцепочечную ДНК, полинуклеотидные цепи которой не содержат разрывов (гл. 1). Такая ДНК часто присутствует только в виде небольшой части общей ДНК. Если ДНК обработать щелочью, водородные связи разрушатся и образуются однотяжевые цепи; однако в случае, когда ДНК представляет собой ковалентно замкнутые кольца, цепи остаются физически связанными. После нейтрализации раствора

ТАБЛИЦА 7-1

Связывание различных веществ с нитроцеллюлозными фильтрами[а]

Вещество	Фильтры		Ионная сила[б]
	Schleicher and Schuell	Millipore	
Белки	+	+	0,01—1,0
Одноцепочечная ДНК	+	Плохо	0,15
	—	—	0,01
Двухцепочечная ДНК	—	—	>0,05
	+[в]	+[в]	0,001—0,005
Одноцепочечная РНК	—	—	0,01—1,0
Комплекс белка с двухцепочечной ДНК	+	+	0,01—1,0

[а] Некоторые данные были предоставлены доктором А. Брауном.
[б] Влияние ионной силы проверяли только в указанных пределах.
[в] Связывание неэффективно.

ДНК и инкубировании его при несколько повышенной температуре структуры ковалентно замкнутых колец быстро восстанавливаются. Единичные цепи, образованные из линейных ДНК, также будут в конце концов восстанавливать двухтяжевую структуру ДНК, но этот процесс очень медленный и к тому же зависит от концентрации ДНК. Кольцевые молекулы ДНК, содержащие один разрыв в одной из цепей, будут разделяться с образованием линейной и кольцевой цепей; восстановление двухтяжевого кольца требует тех же условий, что и для восстановления линейной ДНК. Если ДНК после щелочной обработки пропустить через фильтр фирмы Schleicher and Schuell при высокой ионной силе (табл. 7-1), через фильтр будут проходить только двухцепочечные ковалентно замкнутые кольца (поскольку все остальные компоненты представляют собой отдельные цепи, которые связываются с фильтром) и таким образом они будут очищены (рис. 7-3). Подобную операцию с большими количествами ДНК проводят на колонках с порошкообразной нитроцеллюлозой.

Пример 7-Б. *Анализ информационной РНК.* При пропускании через фильтр раствора одноцепочечной ДНК с последующей его сушкой в вакууме можно получить фильтр, содержащий связанную одноцепочечную ДНК. Эта ДНК остается связанной даже при погружении фильтра в воду. Если радиоактивную РНК и фильтр поместить в небольшой сосуд при ренатурирующих условиях, приводящих к образованию связанного водородными свя-

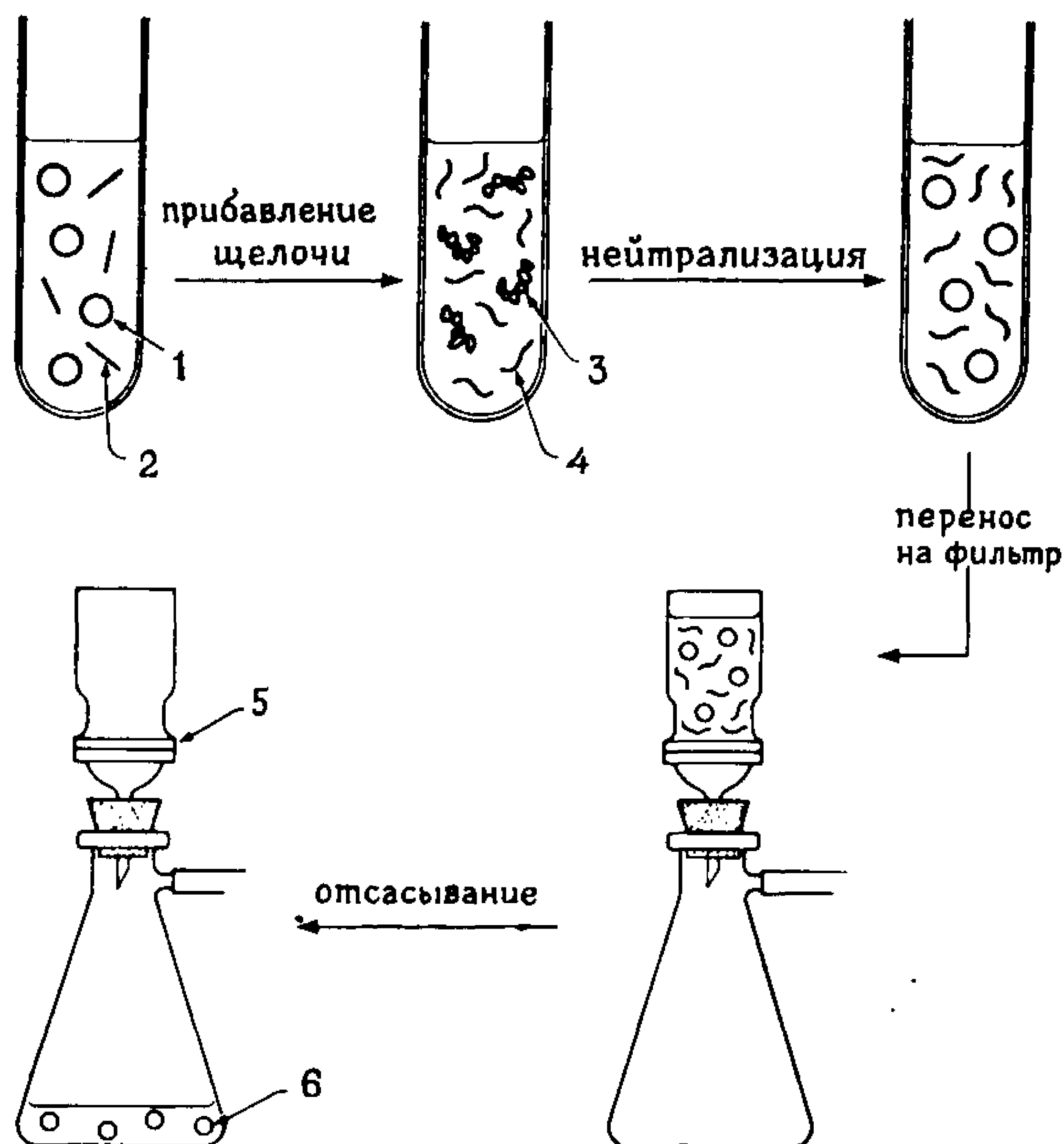


РИС. 7-3.

Схема очистки ковалентно замкнутых двухцепочечных кольцевых ДНК на нитроцеллюлозных фильтрах.

Образец ДНК денатурируют обработкой щелочью. Затем pH доводят до значения, при котором быстро ренатурируют ковалентно замкнутые двухцепочечные кольца, но линейные цепи ренатурируют медленно. Смесь фильтруют. Двухцепочечные кольца проходят через фильтр, а единичные линейные цепи задерживаются на поверхности фильтра. Таким образом получают очищенную фракцию кольцевых двухцепочечных ДНК. *1* — ковалентно замкнутые двухцепочечные кольца; *2* — линейная двухцепочечная ДНК; *3* — денатурированные ковалентно замкнутые кольцевые ДНК; *4* — денатурированные (одноцепочечная) линейная ДНК; *5* — денатурированные цепи остаются на фильтре; *6* — очищенные кольцевые ДНК.

зями комплементарного гибрида ДНК — РНК (гл. 1), и затем фильтр поместить в прибор с разрежением и отмыть, бóльшая часть несвязанной РНК будет смыта с фильтра (рис. 7-4). При обработке ферментом панкреатической рибонуклеазой (которая гидролизует одноцепочечную РНК, но не действует на РНК, участвующую в образовании двухцепочечной структуры) разрушается оставшаяся неспаренная РНК. Затем фильтр тщательно промывают, после чего остается только специфически связанная (гибридизованная) РНК, которую можно определить по радиоактивности.

Если отмытый фильтр затем нагреть до температуры выше температуры плавления гибрида ДНК — РНК (гл. 1), специфически связанная РНК будет освобождаться; этот метод является наилучшим для очистки специфической информационной РНК.

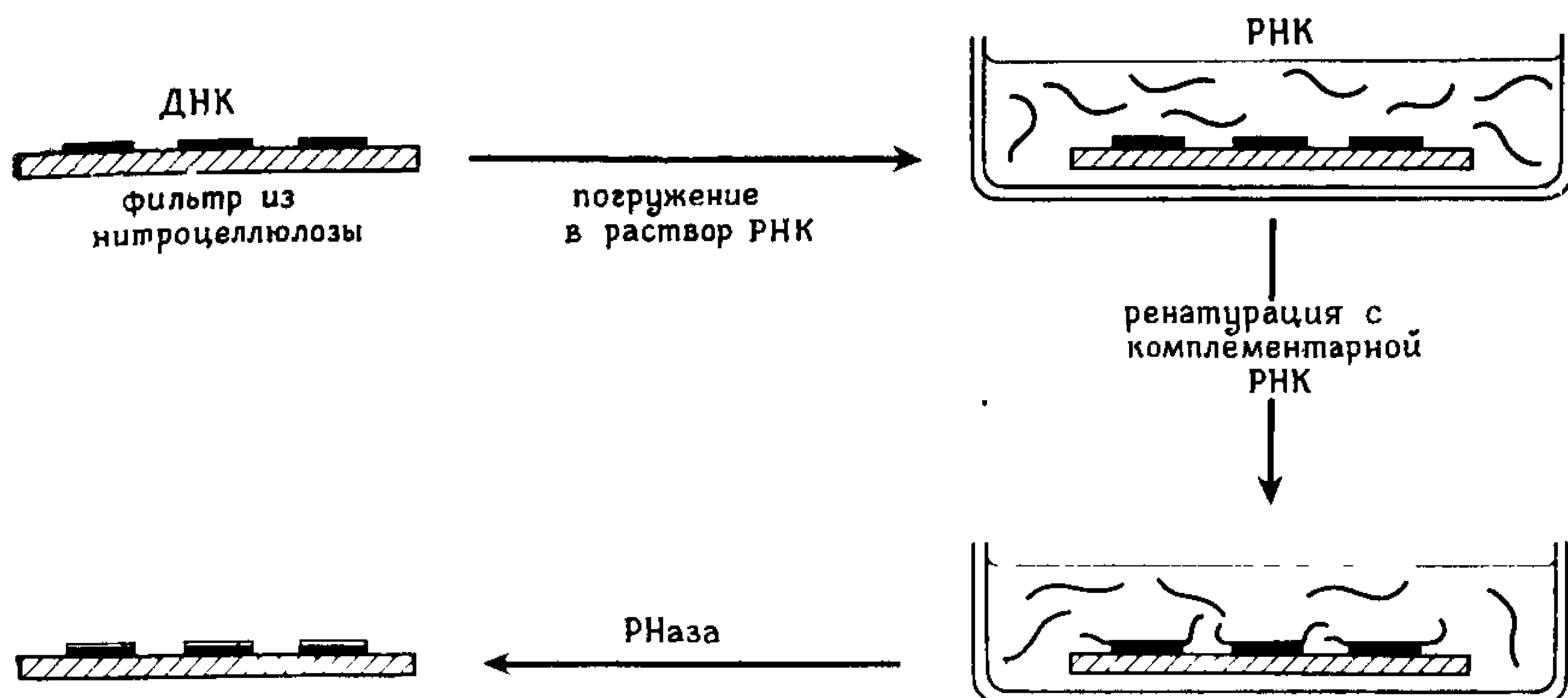


РИС. 7-4.

Метод гибридизации РНК с нитроцеллюлозными фильтрами, содержащими связанную одноцепочечную ДНК.

Пример 7-В. *Анализ комплементарности одноцепочечных ДНК.* Фильтры, содержащие нерадиоактивную связанную одноцепочечную ДНК, приготовленные, как в примере 7-Б, можно использовать для анализа комплементарности одноцепочечной ДНК. Однако при добавлении к таким фильтрам радиоактивной одноцепочечной ДНК естественно будет происходить связывание, независимо от того, имеется ли на фильтре или нет предварительно связанная с ним ДНК (табл. 7-1). Тем не менее, если промыть фильтр, уже содержащий нерадиоактивную ДНК, АБС и поливинилпирролидоном, свободные места связывания одноцепочечной ДНК будут блокированы, т. е. радиоактивная одноцепочечная ДНК не сможет связываться по ним. При погружении предварительно обработанного таким образом фильтра в раствор, содержащий радиоактивную ДНК, в условиях, способствующих гибридизации, как в примере 7-Б, комплементарная радиоактивная ДНК будет ренатурировать с предварительно связанной ДНК. Несвязавшаяся ДНК может быть затем отмыта, что даст возможность определить связанную радиоактивность. Такой метод можно использовать для идентификации некоторых видов ДНК. Например, если бактерию *E. coli* инфицировать фагом λ и инкубировать затем в среде, содержащей ^{3}H-тимидин, будут синтезироваться ДНК как *E. coli*, так и фага λ. Если затем радиоактивную ДНК превратить в одноцепочечную ДНК (с помощью термической или щелочной денатурации) и ренатурировать на фильтре, с которым связана ДНК *E. coli* или фага λ, относительное количество радиоактивности, связывающееся на фильтре в каждом случае, будет указывать долю каждой ДНК в начальной радиоактивной смеси.

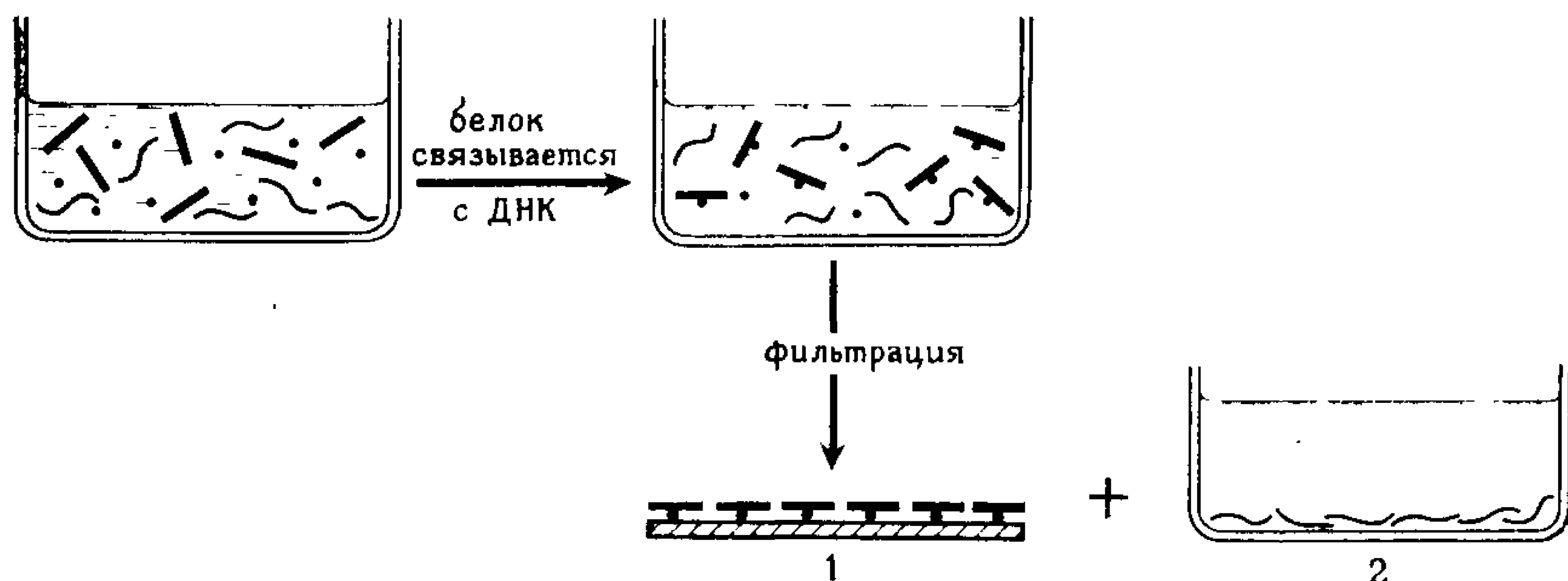


РИС. 7-5.

Анализ ДНК, связывающейся с белком, с помощью адсорбции на фильтре.

Образец содержит белок (черные точки) и два типа ДНК. Белок связывается с ДНК, обозначенной черными линиями, но не связывается с ДНК, обозначенной тонкими линиями. При фильтрации через нитроцеллюлозу весь белок связывается. Молекулы ДНК, связавшиеся с белком, остаются на фильтре. Все другие молекулы проходят сквозь фильтр. Количество адсорбированной радиоактивной ДНК может служить мерой количества связанного белка. *1* — ДНК, связанная с белком; *2* — несвязанная ДНК остается в фильтрате.

Пример 7-Г. *Анализ белков связывающихся с двухцепочечной ДНК.* Если смесь белков инкубировать в обычных условиях с радиоактивной двухцепочечной ДНК, образуется некоторое количество комплексов ДНК — белок, в которых участвуют белки, специфически связывающиеся с ДНК (рис. 7-5). Поскольку белок связывается с фильтром, любая радиоактивная ДНК образует комплекс с белком на фильтре. Такой анализ лучше делать на фильтрах фирмы Millipore, так как для них фон, обусловленный несвязанной ДНК, очень мал (табл. 7-1). Этот простой метод используется при очистке белков-репрессоров, поскольку их можно определить только по способности связываться со специфическими центрами двухцепочечной ДНК. Такой прием находит применение также при определении интермедиатов ДНК — фермент в некоторых реакциях и для измерения числа центров связывания данного белка (например, РНК-полимеразы) с молекулой ДНК.

Различные приложения мембранных фильтров

Мембранные фильтры могут служить также в качестве иммобилизующего агента. Например, при скрещивании переносящих хромосомы мужских (Hfr) штаммов *E. coli* и женских реципиентных штаммов спаривающиеся клетки отрываются друг от друга из-за броуновского движения. При выведении бактериальных

штаммов с особыми свойствами часто бывает необходимо перенести ген. Этот процесс обычно идет в направлении от мужской клетки к женской и требует значительного времени спаривания. Однако такой перенос гена часто прерывается по причине, указанной выше. Если женские клетки будут отделены на мембранном фильтре, а затем мужские будут фильтроваться через них, скрещивание протекает нормально в том случае, когда фильтр помещен на поверхность питательной среды на агаре. Поскольку при этом клетки иммобилизованы, нарушение спаривания незначительно, и частота переноса гена существенно возрастает. После окончания периода скрещивания клетки можно отмыть с фильтра и перенести на обычные агаровые пластинки.

Диализ и молекулярная фильтрация

Обычное фильтрование отделяет *частицы* от жидкости при пропускании суспензии через пористый материал. Однако так называемые полупроницаемые мембраны позволяют разделить *растворенные* молекулы по их величине.

Наиболее известным методом является *диализ,* при котором водный раствор, содержащий одновременно макромолекулы и очень маленькие молекулы, помещают в целлофановый мешок и

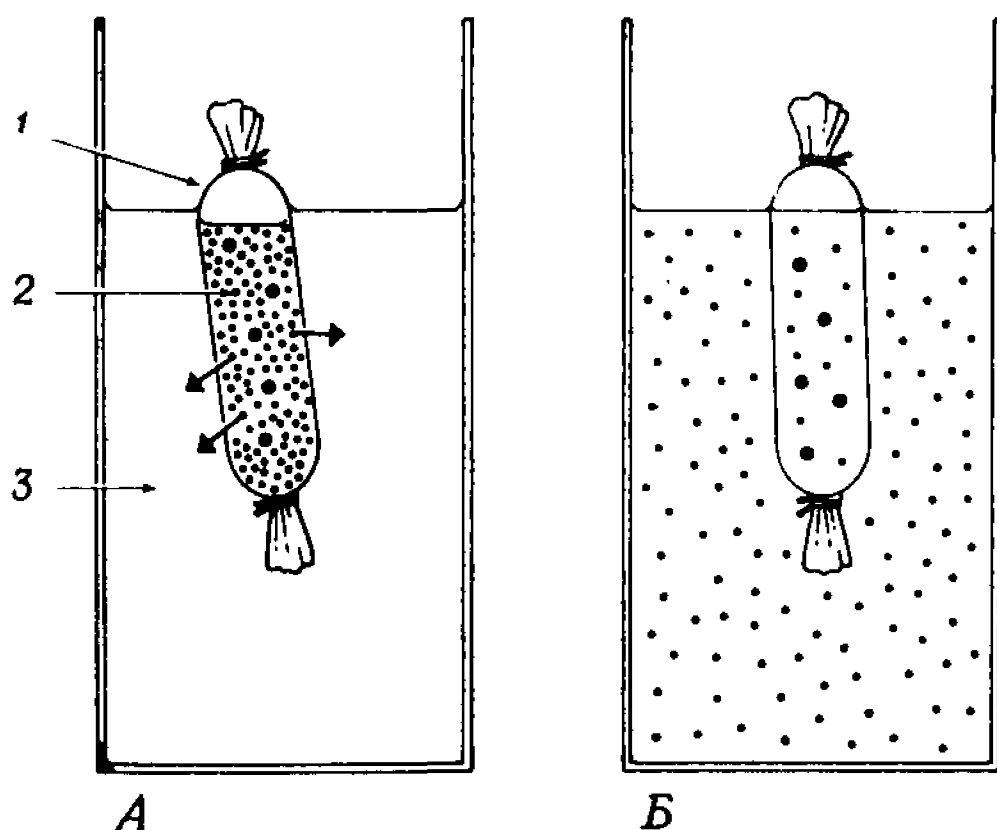


РИС. 7-6.

Диализ.

Только маленькие молекулы (точки) проходят сквозь целлофановую мембрану. В равновесии концентрация маленьких молекул одинакова по обе стороны мембраны. Макромолекулы остаются в мешке. *А* — начало диализа; *Б* — равновесие. *1* — целлофановый мешок; *2* — концентрированный раствор; *3* — буфер.

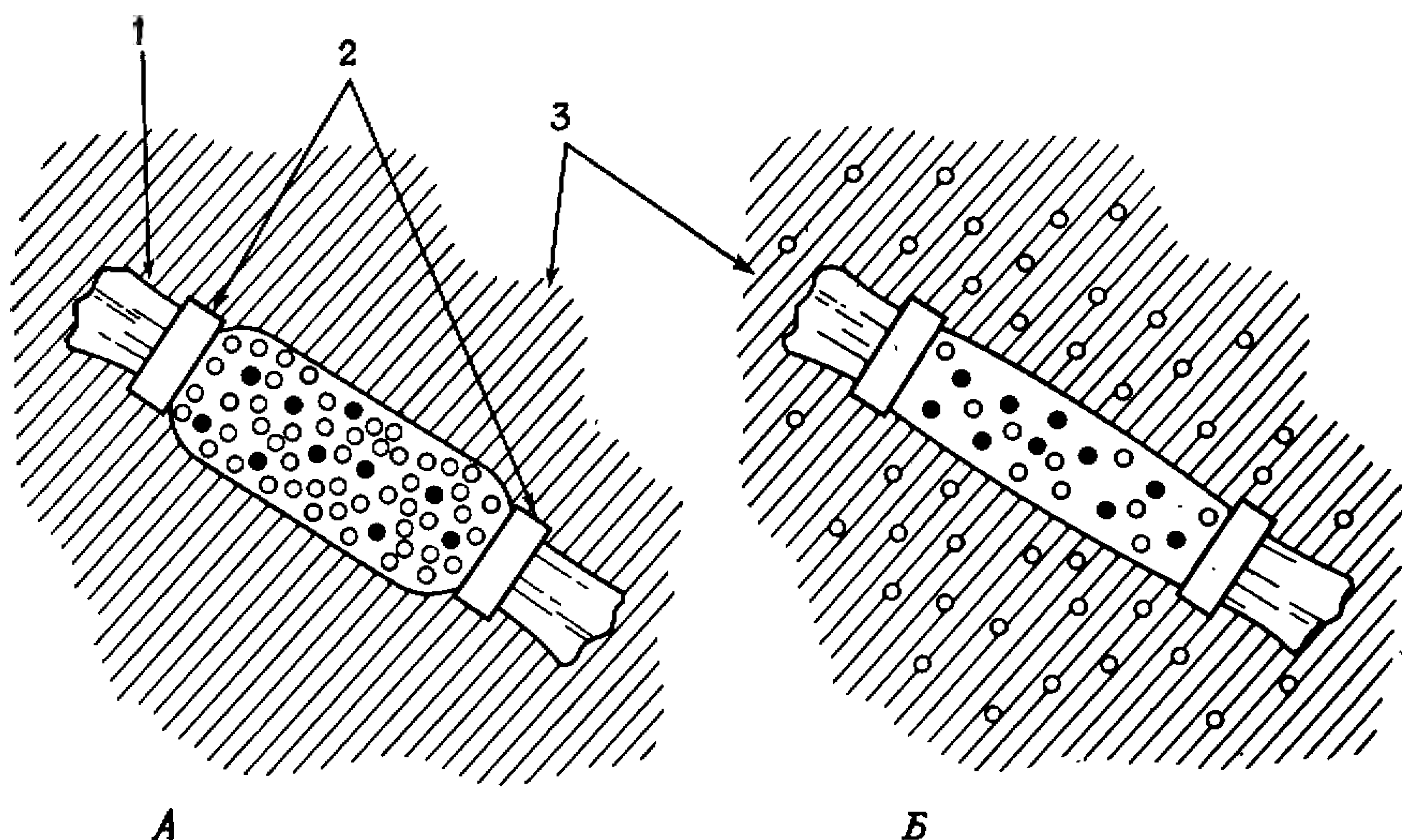


РИС. 7-7.

Обратный диализ.

А — раствор макромолекул (● макромолекулы, О растворитель) помещают в диализный мешок, который покрывают порошком сухого полиэтиленгликоля (ПЭГ); *Б* — молекулы растворителя выходят из мешка и проникают в ПЭГ. Ни ПЭГ, ни макромолекулы не могут проникнуть сквозь мембрану, таким образом раствор концентрируется. *1* — мешок для диализа; *2* — зажимы; *3* — порошок полиэтиленгликоля.

этот мешок погружают в большой резервуар с подходящим буфером (рис. 7-6). Маленькие молекулы из раствора (за исключением сильно заряженных) свободно проходят через мембрану до тех пор, пока не установится равновесие*. Чтобы добиться желаемого состава раствора внутри мешка, внешняя жидкость должна периодически меняться до достижения конечного состава. Вода также свободно проходит сквозь мешок, что приводит к концентрированию или разбавлению в зависимости от того, какой раствор более концентрированный — внутренний или внешний (осмотический эффект).

Вариант, называемый *обратным диализом* (рис. 7-7), может быть использован для концентрирования вещества внутри мешка. Закрытый мешок помещают в сухой водорастворимый полимер, который не может проникнуть сквозь мембрану, например полиэтиленгликоль. Затем вода выходит из мешка, растворяя внешний сухой полимер. С этой целью может быть использована также сахароза, но при удалении воды она будет проникать в мешок, так как легко диализуется.

---

* Здесь под равновесием подразумевается равенство концентраций внутри и снаружи мешка.

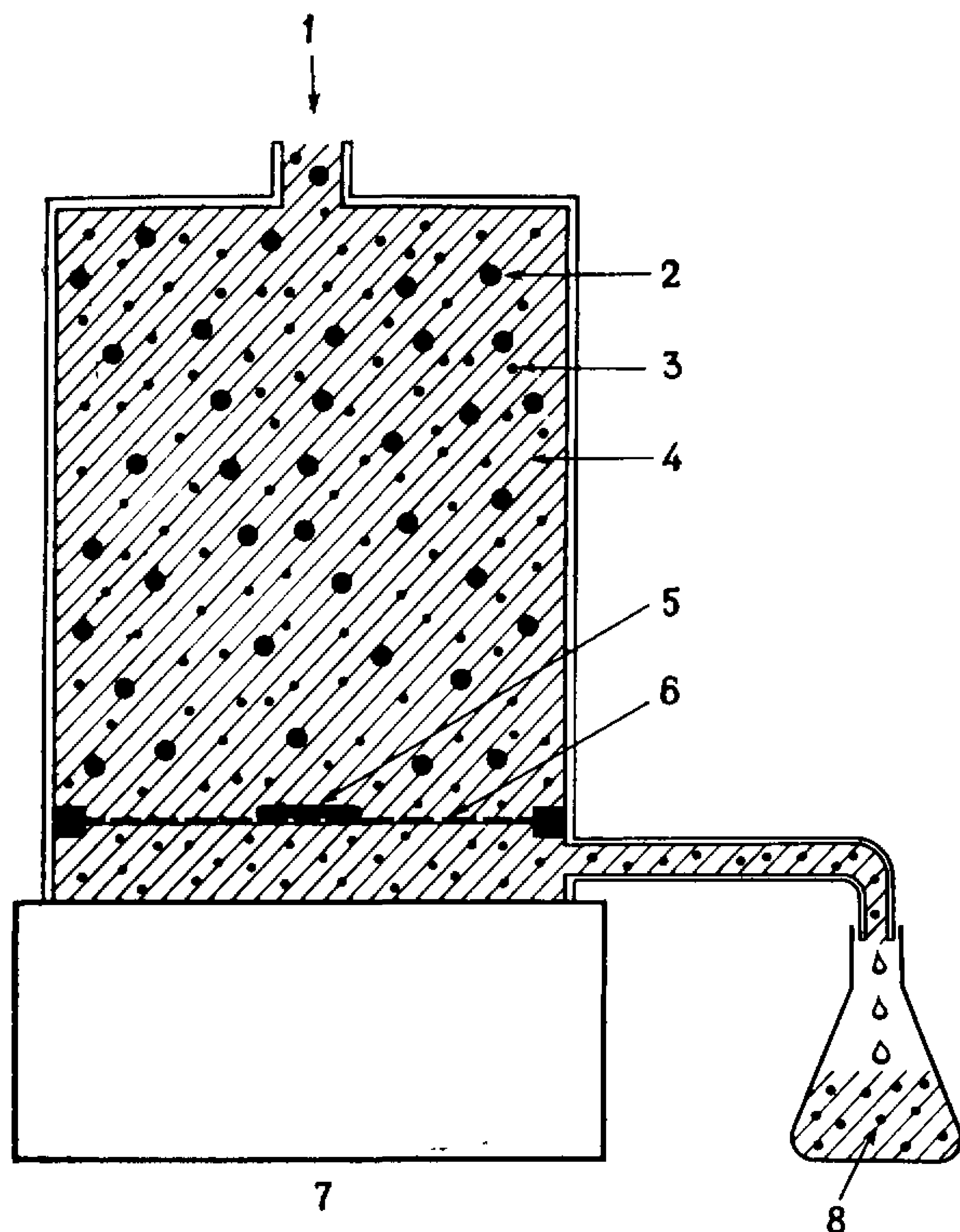


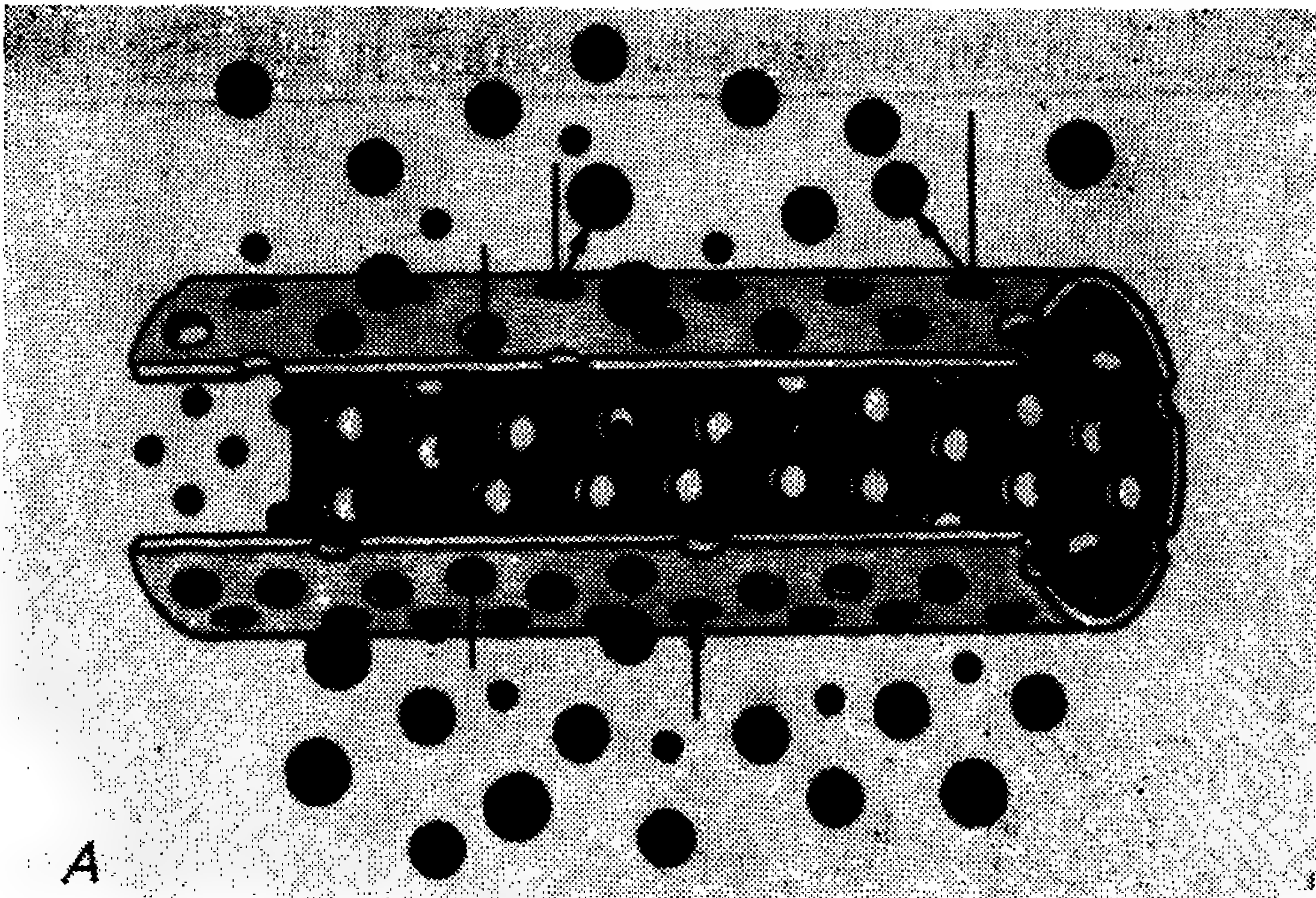
РИС. 7-8.

Устройство для молекулярной фильтрации.

Раствор, содержащий большие и маленькие макромолекулы, продавливают через молекулярную мембрану. Молекулы, размеры которых превышают допустимые, не проходят сквозь мембрану, тогда как растворитель и маленькие молекулы свободно проникают через нее. Вращающийся магнит служит для предотвращения засорения мембраны. Таким способом можно очищать как большие, так и маленькие молекулы. Большие молекулы могут быть этим способом сконцентрированы. *1* — давление воздуха; *2* — большие макромолекулы; *3* — маленькие макромолекулы; *4* — растворитель; *5* — вращающийся магнит; *6* — мембрана; *7* — магнитная мешалка; *8* — растворитель + маленькие макромолекулы.

Полупроницаемые мембраны, которые пропускают малые молекулы, но задерживают большие, изготовляются рядом фирм. В качестве примера можно привести трубки Spectropor (Spectrum Medical Industries, Inc.), которые используются так же, как любая другая пленка для диализа. Они выпускаются трех типов с порами, пропускающими вещества с молекулярной массой от 6000 до 14 000.

Важной модификацией приспособлений для диализа служат мембраны Diaflo (Amicon Corporation) или Pellicon (Millipore Corporation). Они представляют собой очень тонкие (0,1—



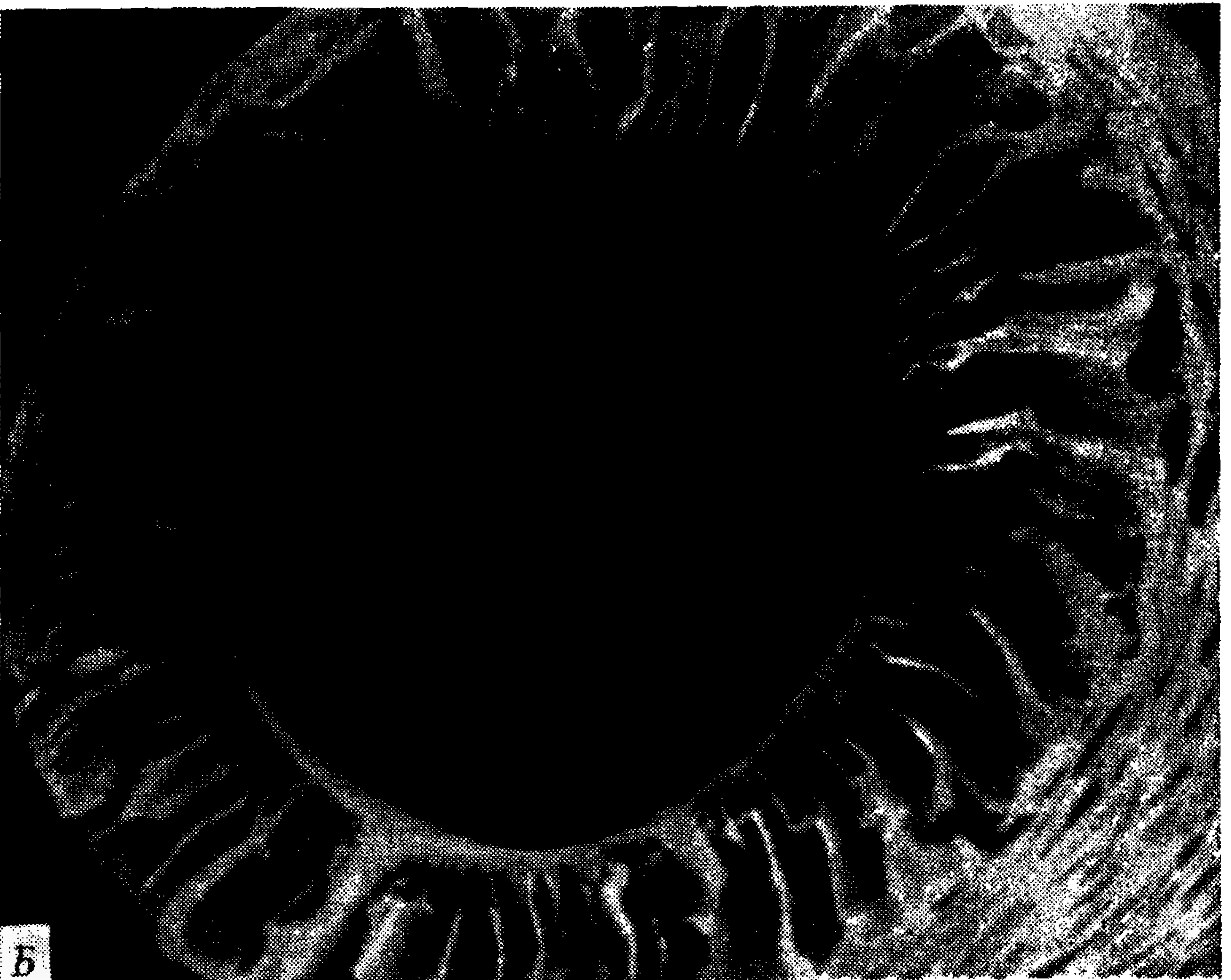


РИС. 7-9.

А — действие полых волокон. Волокно первоначально погружают в раствор с большими и маленькими молекулами. Маленькие молекулы проходят через поры волокна во внутренний канал и уносятся потоком воды. Большие молекулы не могут пройти сквозь поры. (Любезно предоставлено Bio-Rad Laboratories.) *Б* — электронная микрофотография полого волокна. (С разрешения Amicon Corporation.)

1,0 мкм) полимерные мембраны с размером пор от 2 до 100 Å, укрепленные на более толстом (50—250 мкм) поддерживающем слое с губчатой структурой. Диапазон молекулярных масс пропускаемых молекул варьирует в пределах от 500 до 100 000. Такие мембраны используют для концентрирования (для этого берут мембраны, пропускающие только воду), обессоливания при подготовке образцов для хроматографии и фракционирования по молекулярной массе. Скорость потока через эти мембраны настолько мала, что работать с ними можно только под давлением. Для их использования обычно требуются специальные держатели (рис. 7-8). Такие устройства выпускаются в различных модификациях, позволяющих работать с большими или малыми объемами или с несколькими образцами.

Диализ через полые стеклянные волокна

Полупроницаемые стеклянные волокна служат полезными устройствами как для диализа, так и для концентрирования. Они представляют собой пустотелые волокна, стеклянные стенки которых обладают порами с контролируемым размером. Молекулы, размер которых меньше размера пор, свободно проходят через стенки волокон (рис. 7-9, *А*). Эти волокна обычно используют в виде пучков, что позволяет получить очень большую площадь поверхности. Пучки, как правило, изготовляют в виде блоков, один из типов которых изображен на рис. 7-10. Чтобы сменить буфер в образце, содержащем макромолекулы, на другой буфер, образец помещают в сосуд, а через волокна пропускают большой объем второго буфера (рис. 7-10, *А*). Маленькие молекулы двух буферов быстро обмениваются через поры волокон; поскольку буфер, протекающий по волокнам, находится в избытке, первый буфер заменяется вторым. Макромолекулы при этом не могут проникнуть в поры и остаются снаружи. Если требуется провести обессоливание, то через волокна пропускают воду. Для концентрирования растворов используют установку, изображенную на рис. 7-10, *Б*. Здесь раствор также помещают в сосуд, волокна присоединяют к вакууму. Разность давлений перемещает растворитель и растворенное вещество к волокнам, при этом происходит концентрирование раствора. Возможны и другие приемы для пропускания растворов через волокна, однако они используются редко, что связано с быстрым засорением волокон.

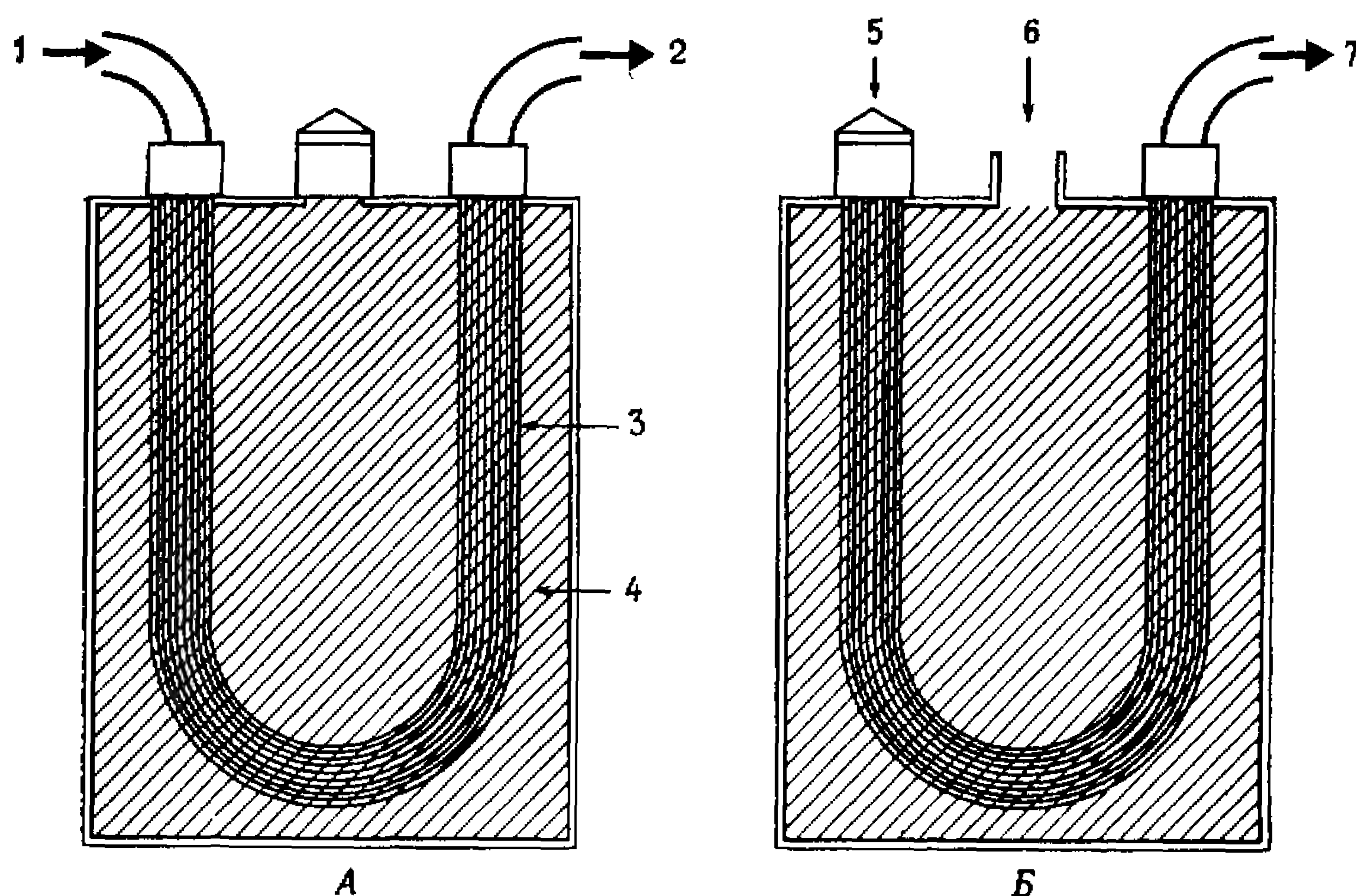


РИС. 7-10.

Два способа использования полых волокон.

А — диализ; когда растворитель течет по волокнам, маленькие молекулы проходят в волокна, что понижает их концентрацию в образце; *Б* — концентрирование; для этого пучок волокон присоединяют к вакууму, в результате чего растворитель и маленькие молекулы попадают в волокно и таким образом в образце происходит концентрирование макромолекул. *1* — вход растворителя; *2* — выход растворителя; *3* — волокна; *4* — образец; *5* — запаянный патрубок; *6* — вход воздуха; *7* — разрежение.

Список литературы

Bøvre K., Szybalski W., Multi-step DNA—RNA Hybridization Techniques, in "Methods in Enzymology", vol. 21, edited by L. Grossman and K. Moldave, Academic Press, 1971, pp. 350—382.

Kennell D., Use of Filters to Separate Radioactivity in RNA, DNA, and Protein, in "Methods in Enzymology", vol. 12A, edited by L. Grossman and K. Moldave, Academic Press, 1971, pp. 686—692.

Millipore Corporation, Molecular Filtration.

Прекрасные брошюры выпускаются фирмами H. Reeve Angel, Inc. (свойства фильтров из бумаги и стекловолокна), Amicon Corporation (мембраны Диафло), Millipore Corporation (фильтры из нитроцеллюлозы и мембраны Пелликон) и Schleicher and Schuell (фильтры из нитроцеллюлозы).

Задачи

7-1. Предположим, что вам предстоит отделить осадок из ацетонового раствора. Какой фильтр будет в этом случае более пригоден, нитроцеллюлозный или из стекловолокна? Почему?

7-2. Если вы отделяете осадок из водного раствора, какими критериями следует пользоваться, чтобы сделать выбор между фильтрацией и центрифугированием?

7-3. Размер частиц, вероятно, меньше, чем размер пор данного нитроцеллюлозного фильтра, однако они эффективно отделяются на фильтре. Они могут адсорбироваться или давать большие ассоциаты. Как можно различить эти альтернативные возможности?

7-4. Линейные и кольцевые молекулы ДНК, имеющие одинаковую молекулярную массу, можно разделить на нитроцеллюлозном фильтре при условии, что скорость потока очень велика. При низкой скорости потока разделения не происходит. Какие молекулы при этом будут оставаться на фильтре? Почему?

7-5. Питательная среда для выращивания биологического материала должна быть стерильной. Обычно стерилизацию проводят путем нагревания раствора до 135°C. Однако это не всегда возможно, так как некоторые компоненты при нагревании могут разлагаться. Объясните, каким образом фильтрация может использоваться для стерилизации. Опишите, какие компоненты должны при этом стерилизоваться и как вы будете это осуществлять.

7-6. При подготовке образцов белка или нуклеиновой кислоты в результате прибавления трихлоруксусной кислоты обычно происходит полимеризация смесей для сцинтилляционного счета. Получающийся полимер нерастворим в кислоте, в то время как мономер растворим. Если эту смесь профильтровать, полимер остается на фильтре, а мономер проходит сквозь него. Все же небольшая часть мономера часто адсорбируется. Если в смеси было 10^6 имп/мин мономера, 0,02% заполимеризовалось и 0,01% адсорбировалось, фоновая радиоактивность будет достаточно высокой, чтобы давать надежный счет. Приняв, что белки и нуклеиновые кислоты растворимы в щелочи, разработайте методику понижения фона. Определите тип фильтра, который следует использовать, и определите фон, получающийся в результате усовершенствованной методики.

7-7. Предположите, что вы отделяете на фильтре бактериальную массу для того, чтобы перенести ее на новую питательную среду. Перенос осуществляется следующим образом: фильтр помещают в новую среду с последующим помешиванием для смывания бактерий. В серии опытов вы нашли, что число бактерий, снимаемых с фильтра, является функцией общего числа отделенных бактерий, и получили следущие данные:

Число отделяемых бактерий	Количество бактерий, смытых с фильтра, %
$5 \cdot 10^8$	98
$3 \cdot 10^8$	100
$1 \cdot 10^8$	89
$5 \cdot 10^7$	50
$3 \cdot 10^7$	35

Чему равен выход с фильтра (приблизительно), если отделили 10^7, 10^6 и 10^5 бактерий? Объясните.

7-8. Хорошо известно, что пленка для диализа адсорбирует как белки, так и нуклеиновые кислоты. Объясните, каким образом вы сможете определить наличие такой адсорбции в случае данного белка или нуклеиновой кислоты. Ферменты теряют биологическую активность при диализе. Как можно отличить адсорбцию от инактивации для данного фермента?

III ЧАСТЬ

РАЗДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЕЩЕСТВ

ГЛАВА 8

Хроматография

Одной из основных задач биохимии является разделение и идентификация химических соединений. Хроматография — очень эффективный метод для достижения этой цели. Общеизвестно, что метод был разработан в 1906 г. русским ботаником Михаилом Цветом, который разделял растительные *пигменты* (отсюда и название); однако следует отметить, что в 1855 г. немецкий химик Карл Рунге применил хроматографию на бумаге для разделения неорганических веществ. Более того, Плиний Старший сообщал о разделении красителей на папирусе и существовании хроматографического теста на железо с использованием папируса. Все же хроматография стала по-настоящему серьезным методом только в 1944 г., после работ Арчера Мартина и Джона Синджа, получивших Нобелевскую премию за разработку методологии распределительной хроматографии.

В настоящее время известно большое число различных видов хроматографии (адсорбционная, распределительная, ионообменная, на молекулярных ситах) и различных приемов их применения (колоночная, на бумаге, тонкослойная, газовая). Это обусловлено тем, что хроматография может использоваться для решения разнообразных задач, начиная от получения относительно больших количеств чистого вещества и кончая аналитическими процедурами, позволяющими идентифицировать какие-либо вещества. В данной главе будут рассмотрены основы каждого вида хроматографии и их модификации.

Распределительная хроматография

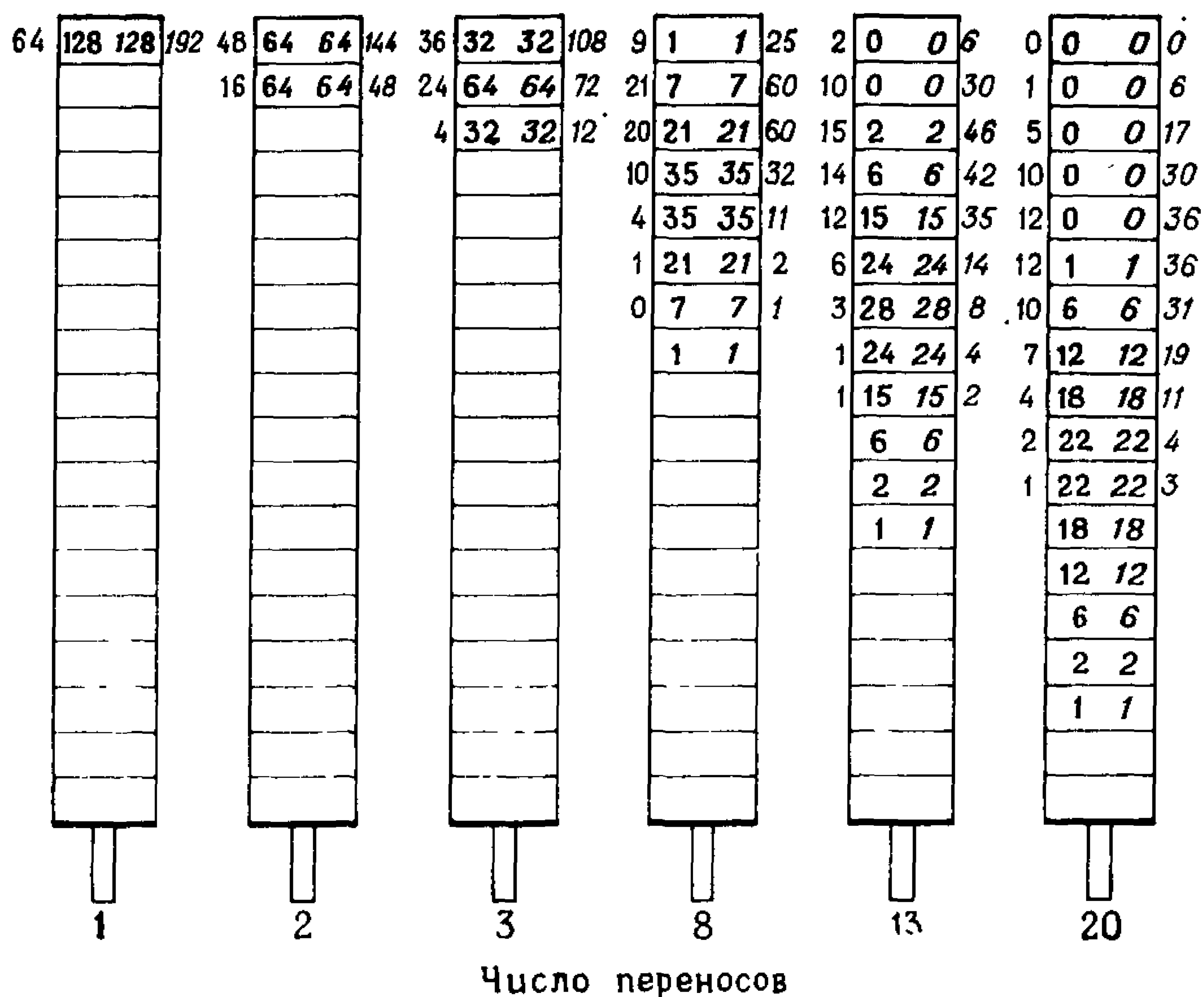
Теоретические основы распределительной хроматографии

Сильно различающиеся между собой вещества, например железные опилки и частицы стекла, легко можно разделить с помощью магнита; сахар и песок разделяются путем растворения сахара в воде. Однако, если вещества обладают сходными физическими и химическими свойствами, процесс разделения сильно усложняется. Принцип хроматографии состоит в том, что вещества помещают в систему, которая содержит два физически различных компонента — *подвижную* и *неподвижную* (стационарную) *фазы* и в которой разделение по типам молекул происходит за счет различий (часто весьма незначительных) в распределении между этими двумя фазами. Относительная подвижность каждой молекулы зависит от соотношения между движущей силой, которой здесь является движение подвижной фазы, и силами удерживания, к которым в первую очередь следует отнести распределение и адсорбцию.

В распределительной хроматографии принята следующая терминология. Стационарная фаза называется *сорбентом*. Если сорбент представляет собой жидкость, которая удерживается каким-либо твердым телом, это тело носит название *носителя* или *матрицы*. Подвижная фаза называется *растворителем* или *проявителем*, а компоненты разделяемой смеси — *растворенными веществами*.

Распределительная хроматография основана на следующем: если две фазы находятся в контакте друг с другом, причем одна из них или обе содержат растворенное вещество, это вещество будет распределяться между двумя фазами. Этот процесс именуется распределением и количественно описывается *коэффициентом распределения*, представляющим собой отношение концентраций растворенного вещества в каждой из двух фаз.

Мы будем рассматривать распределительную хроматографию на *колонке*, где колонкой служит трубка, заполненная сорбентом и растворителем. Раствор, содержащий разделяемую смесь, вводят в колонку так, чтобы растворенные вещества проникли в сорбент. Затем через колонку пропускают растворитель. Хотя сорбент и растворитель распределены по всей колонке равномерно, колонку можно рассматривать как совокупность множества отдельных слоев («теоретических тарелок»), каждый из которых содержит две фазы. Представим, что 256 *идентичных* молекул, которые равномерно распределяются между неподвижной и под-



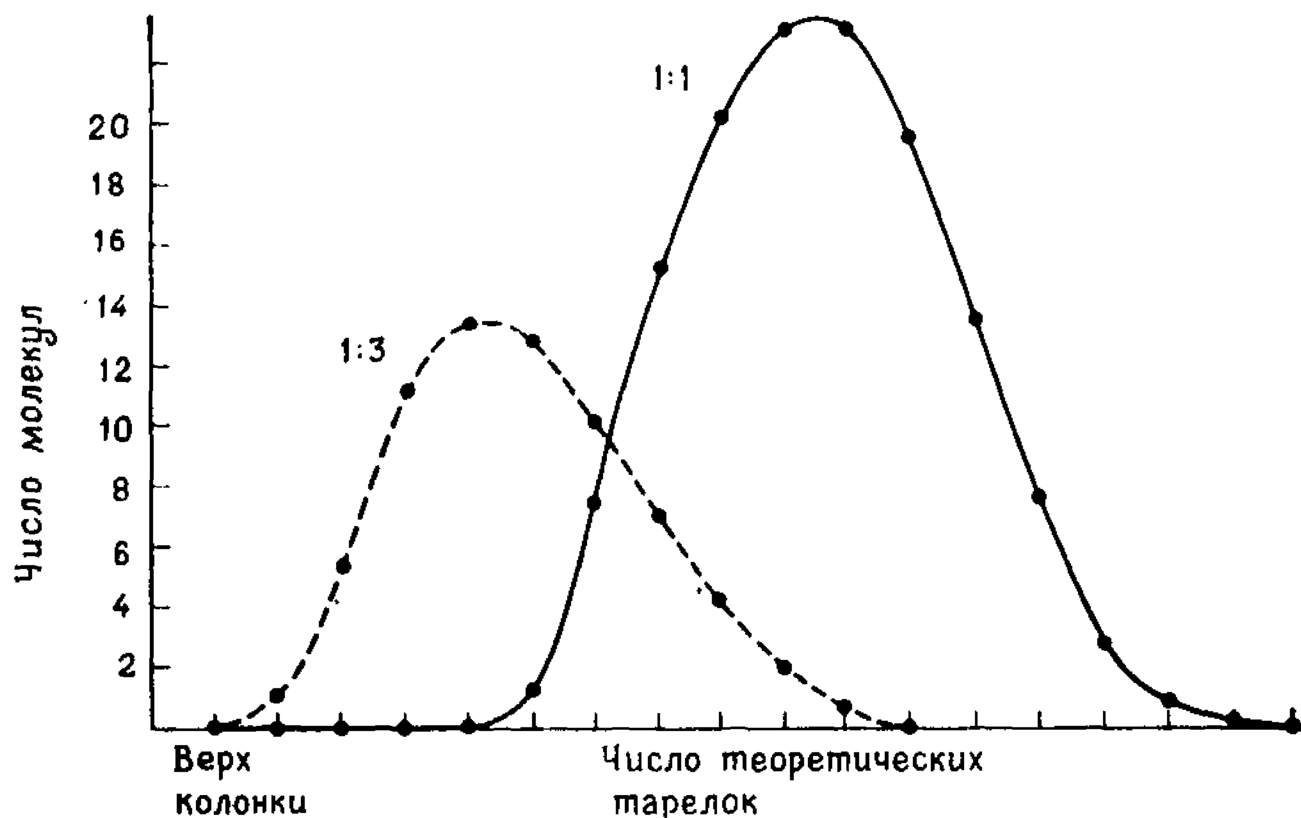


РИС. 8-1.

Принцип действия колонки, в которой разделение основано на распределении.

Колонка произвольно разделена на 18 теоретических тарелок. На колонку нанесено 512 молекул. Из них 256 (жирный шрифт) распределяются поровну между подвижной фазой (прямой шрифт) и неподвижной фазой (курсив); это категория 1 : 1. Категория 1 : 3 (тонкий шрифт) распределяется таким образом, что в подвижной фазе находится 25%, а в неподвижной — 75% молекул. При переносе все вещества в подвижной фазе переходят на следующую теоретическую тарелку. После каждого переноса число молекул каждой категории перераспределяется в соответствии с правилом 1 : 1 и 1 : 3. График показывает распределение каждой категории молекул после 20 переносов. Заметим, что вещество категории 1 : 3 медленнее движется через колонку.

вижной фазами, введены в колонку с 18 теоретическими тарелками (рис. 8-1). В верхней теоретической тарелке (*начальной*) 256 молекул распределены так, что в каждой фазе находится по 128 молекул. При переходе 128 подвижных молекул с первой теоретической тарелки на вторую они распределяются на ней по 64; оставшиеся на первой теоретической тарелке 128 молекул перераспределяются по 64 в каждой фазе, как показано на рис. 8-1. При продвижении подвижных фаз еще на одну теоретическую тарелку снова происходит перераспределение. После 20 последовательных переносов достигается состояние, изображенное на рис. 8-1. Предположим, что на первой теоретической тарелке находится 256 молекул *другого типа* (на рис. 8-1 цифры снаружи колонки), которые в 3 раза больше распределяются в неподвижную фазу. На рис. 8-1 показано также их распределение после 20 переносов. Распределение этих двух видов молекул сильно различается, поэтому в результате отделяется значительная часть молекул. Чем больше число теоретических тарелок (т. е. длина колонки), тем лучше разделение. Следует отметить, что при увеличении числа теоретических тарелок вещество распределяется по большей части колонки. В действительности, когда число молекул огромно (т. е. больше 10^{16}), число молекул на первой теоретической тарелке отличается от нуля. С другой стороны, степень распределения уменьшается в том смысле, что *бóльшая доля* вещества находится на небольшой части теоретических тарелок. Например, после 8 переносов 40% молекул, которые на рис. 8-1 распределяются 1 : 1, содержится в $^4/_8$ теоретических тарелок, после 20 переносов 40% содержится уже в $^6/_{16}$, или $^3/_8$, теоретических тарелок. Отсюда ясно, что в идеальном случае, когда разделение определяется только распределением, *разделение двух веществ будет более эффективным при увеличении длины колонки.*

Примеры распределительной хроматографии

Чаще всего используют два типа распределительной хроматографии — *хроматографию на бумаге* и *тонкослойную*. В обоих случаях носитель содержит связанную жидкость: молекулы воды связаны с целлюлозой при хроматографии на бумаге, а при тонкослойной хроматографии с носителем связан растворитель, используемый для получения тонкого слоя (см. разд. «Тонкослойная хроматография»). (Эти методы иногда рассматривают как разновидность адсорбционной хроматографии, поскольку степень разделения зависит и от эффектов адсорбции, однако основным процессом здесь является распределение.) Другими примерами распределительной хроматографии служат *газожидкостная* и *гель-проникающая хроматография,* которые будут подробно рассмотрены ниже.

Распределительная хроматография может осуществляться и на колонках, содержащих носитель, который не адсорбирует растворенные вещества. Распространенными материалами являются диатомовая земля (например, целит), силикагель, порошок целлюлозы и некоторые сшитые декстраны (например, сефадекс LH20). Неподвижную фазу готовят путем суспендирования носителя или промывания колонки выбранным сорбентом. При этом сорбент либо покрывает частицы носителя, удерживаясь на них за счет адсорбции, либо просто проникает в промежутки между частицами и удерживается там под действием капиллярных эффектов. При этом важно добиться того, чтобы неподвижная фаза не заполняла пространство между частицами, которое предназначено для прохождения подвижной фазы. Типичными материалами для неподвижных фаз в случае разделения неполярных веществ служат гидрофобные растворители, такие, как бензол; для разделения полярных соединений применяют гидрофильные растворители, например спирты. Подвижными фазами при разделении неполярных веществ служат обычно спирты или амиды, а для полярных — вода. Обратите внимание, что в качестве неподвижной фазы используются жидкости.

Распределительную хроматографию в первую очередь применяют для разделения низкомолекулярных веществ. Для уменьшения диффузии, которая приводит к уширению пиков, необходимо добиваться очень маленьких стартовых зон и максимальной скорости разделения. Конкретные методики будут приведены в разделах, посвященных хроматографии на бумаге и тонкослойной хроматографии.

Адсорбционная хроматография

Теоретические основы адсорбционной хроматографии

Рассмотрим поверхность твердого тела, содержащую множество разнообразных центров связывания, например участки, богатые электронами (отрицательно заряженные), бедные электронами (положительно заряженные), неполярные и т. д., и жидкость, содержащую растворенное вещество, находящуюся в контакте с такой поверхностью. Если связывание обратимо, то число молекул, связанных с поверхностью, будет пропорционально концентрации растворенного вещества. Эта зависимость может быть трех типов (рис. 8-2). Такие кривые называются *изотермами адсорбции*. Чаще всего встречается восходящая кривая, которая соответствует первоочередному связыванию по центрам, обладающим большим сродством, так что дополнительные количества растворенного вещества связываются менее прочно. Изотерма связыва-

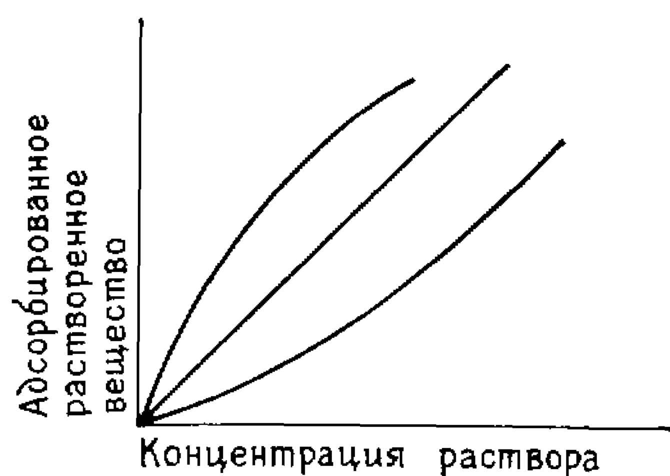


РИС. 8-2.

Три общих типа распределения растворенного вещества между адсорбентом и растворителем как функция концентрации растворенного вещества.

Эти кривые называются изотермами адсорбции. Поскольку количество связываемого вещества зависит от концентрации, распределение как функция числа переносов более сложно, чем на рис. 8-1.

ния характеристична для конкретной молекулы и сорбента. Если раствор с данной концентрацией молекул нанести на поверхность (которая обычно представляет собой множество частиц в колонке или на твердой подложке) и растворитель пропускать в направлении, перпендикулярном поверхности, определенное число молекул будет удерживаться, а остальные будут двигаться вместе с растворителем. Продвигающееся вещество будет связываться, причем необходимо учитывать два следующих параметра: 1) удерживающей силой является связывание или адсорбция и 2) количество связанного вещества не постоянно, а уменьшается с уменьшением концентрации. Скорость движения вещества зависит от прочности связывания, т. е. чем прочнее связывание, тем медленнее движется вещество. Отсюда понятно, что молекулы можно разделить в том случае, когда для них характерны неодинаковые изотермы адсорбции, поскольку в этом случае они будут связываться в различной степени.

Виды адсорбционной хроматографии

В адсорбционной хроматографии используется подвижная жидкая фаза и твердая неподвижная, за исключением газожидкостной хроматографии (см. разд. «Газожидкостная хроматография»). Разделение проводят либо на колонках, либо в тонком слое. В табл. 8-1 приведены наиболее распространенные адсорбенты и области их применения.

ТАБЛИЦА 8-1

Носители, наиболее часто используемые для адсорбционной хроматографии

Носитель	Разделяемые вещества
Окись алюминия	Низкомолекулярные органические соединения, белки
Силикагель	Стерины, аминокислоты
Активированный уголь	Пептиды, аминокислоты, углеводы
Кальцийфосфатный гель	Белки, полинуклеотиды
Гидроксиапатит	Нуклеиновые кислоты

Важным вариантом адсорбционной хроматографии является ионообменная хроматография (см. разд. «Ионообменная хроматография»). Основное его отличие заключается в том, что состав подвижной фазы выбирается так, чтобы при используемом адсорбенте растворенное вещество становилось иммобилизованным. При этом вещество остается неподвижным до тех пор, пока не будет добавлена новая подвижная фаза. В принципе здесь нет особых отличий, однако адсорбция в этом случае исключительно сильна.

Важно усвоить, что распределительная и адсорбционная хроматография не имеют обычно четких границ; так, явления адсорбции могут иметь место при хроматографии на бумаге, тонкослойной и гель-проникающей хроматографии.

Работа колонки

Вероятно, наиболее распространенным способом формирования неподвижной фазы служит использование колонок. В колоночной хроматографии колонка заполняется неподвижной фазой и раст-

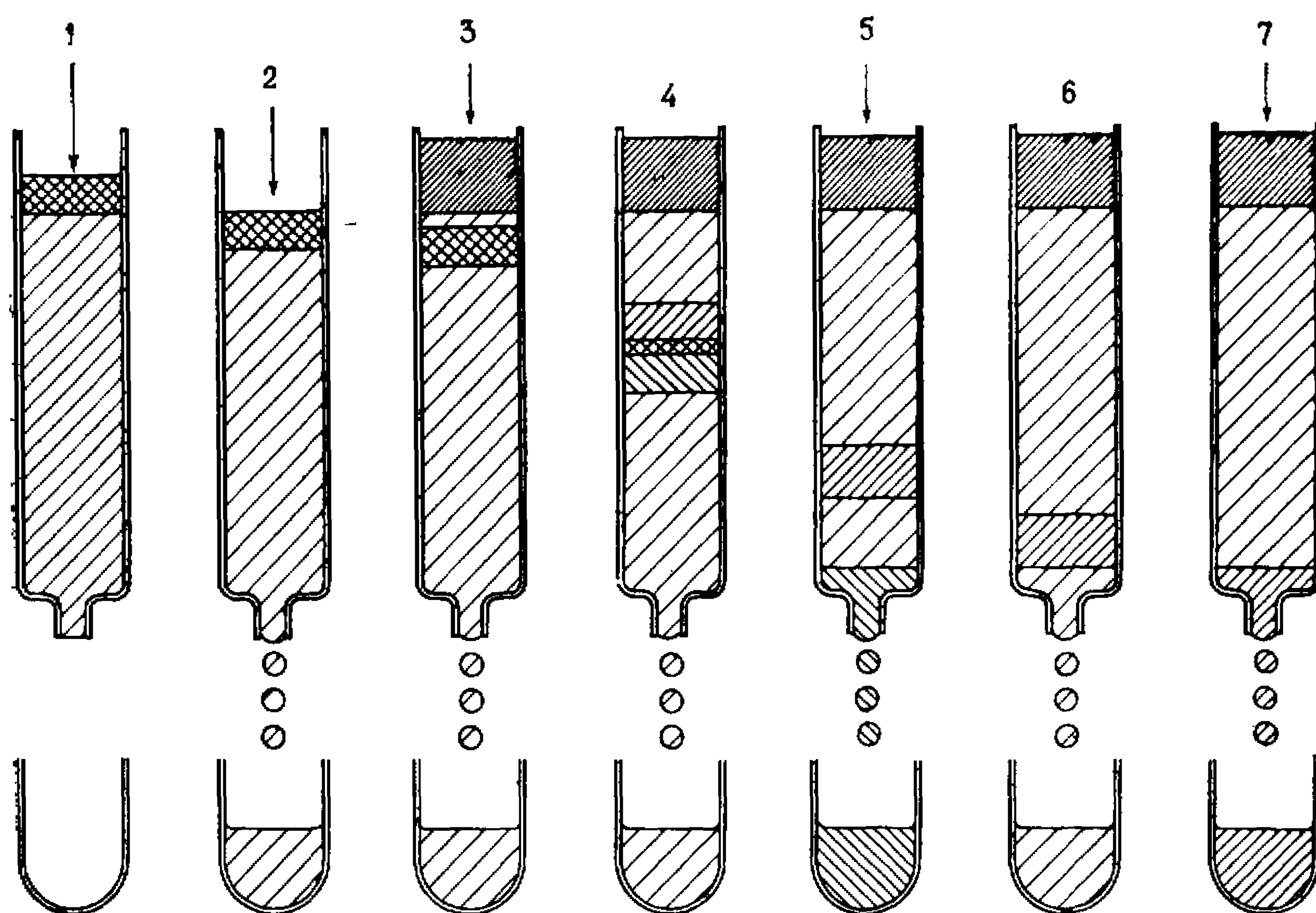


РИС. 8-3.

Работа с колонкой, включая введение вещества и различные стадии элюирования.

1 - образец вводится тонким слоем на колонку; *2* — образец проникает в насадку; *3* — добавляется растворитель; *4* — разделение начинается; *5* — элюируется первый компонент; *6* — элюирование продолжается; *7* — элюируется второй компонент.

ворителем. Затем небольшой объем (т. е. тонкий слой) образца наносится на неподвижную фазу таким образом, чтобы он проник в верхний слой (это называется *загрузкой* колонки). Хроматограмма проявляется при протекании через колонку растворителя(подвижной фазы), как показано на рис. 8-3. Этот процесс называется *элюированием* колонки. При движении различных веществ через колонку они разделяются и при пропускании через колонку определенных количеств растворителя появляются в элюате. Общий объем твердой и жидкой фаз в колонке называется *мертвым объемом* (объемом насадки). Объем подвижной фазы носит название *холостого* или *удерживаемого* объема. Количество жидкости, необходимое для образования пика конкретного вещества в элюате, называется *объемом элюирования.*

Способ, которым в колонке формируется *насадка,* называется *упаковкой (набивкой).* Важно, чтобы насадка была гомогенной и свободной от пузырей, трещин или незаполненных пространств, особенно вблизи стенок. Процесс нарушения потока, являющийся результатом недостаточной гомогенности, носит название *образования каналов.* Обычно в результате образования каналов искажается профиль элюирования, при котором индивидуальные вещества выходят в виде нескольких пиков. Это происходит из-за быстрого движения подвижной фазы через колонку, вследствие чего наблюдается перенос распределения или адсорбции в новую точку.

Выходящая из колонки жидкость (элюат) обычно собирается в виде отдельных фракций при помощи автоматического коллектора фракций, как показано на рис. 8-4. Разделенные компоненты затем определяются в аликвотах, отбираемых из каждой фракции, с помощью спектральных измерений, химических тестов, измерения радиоактивности и т. д. Для измерения поглощения света применяют автоматический самопишущий спектрофотометр непрерывного действия. Прежде чем вещество попадет в коллектор, элюат проходит через кювету, в которой постоянно измеряется оптическая плотность при соответствующей длине волны; результаты измерения регистрируются самописцем.

Элюирование осуществляется тремя способами: в простейшем варианте один растворитель *постоянно* пропускается через колонку. Это обычный метод в случае ионообменной или гель-проникающей хроматографии.

Ступенчатое, или *периодическое, элюирование* используется при препаративных разделениях на колонке. Колонку промывают определенным количеством одного растворителя, а затем используют другой растворитель. Преимуществом такого метода является возможность точного подбора условий, позволяющих получать конкретные компоненты в малых объемах элюата. Возьмем, например, смесь веществ, одно из которых X удерживается

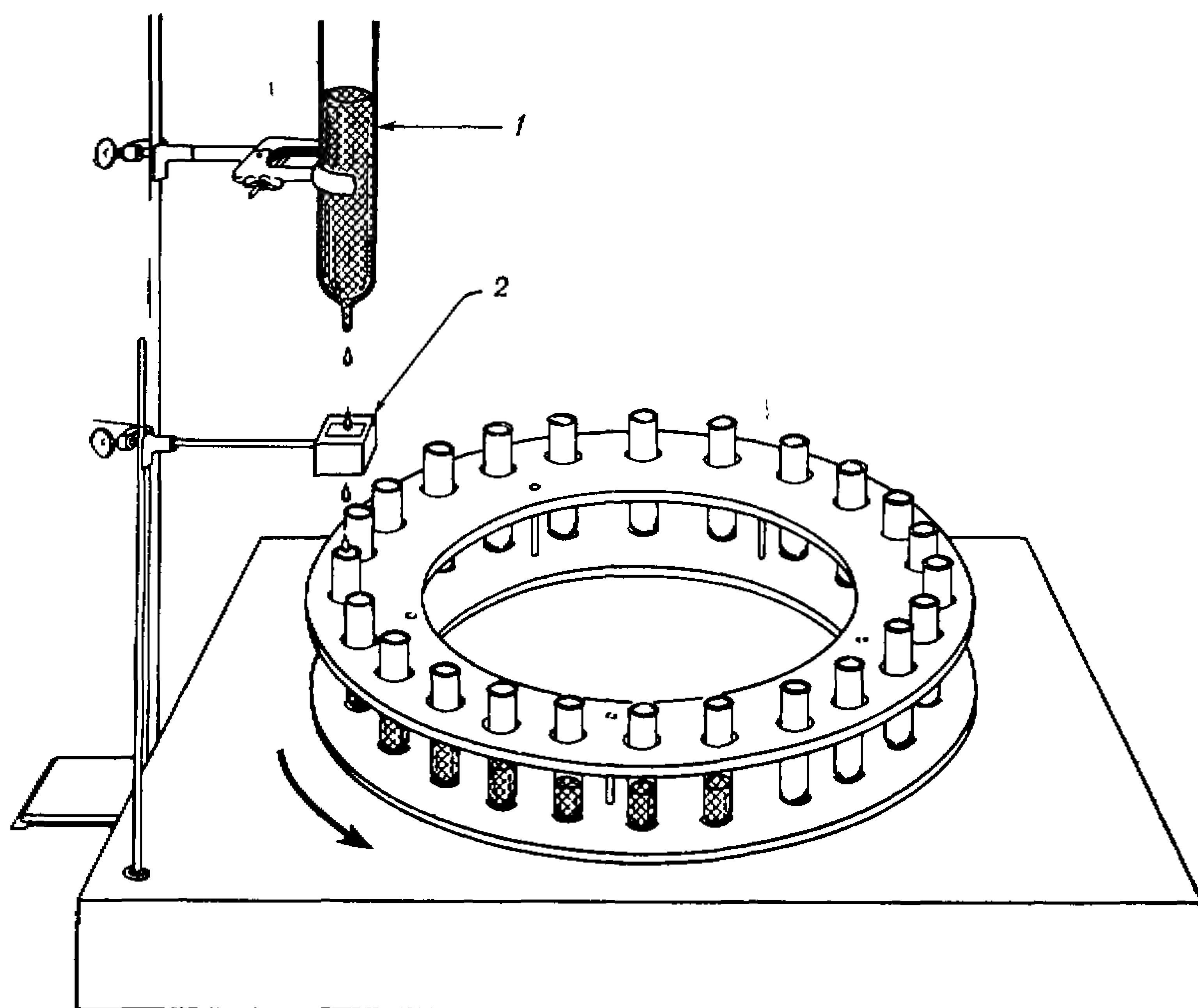


РИС. 8-4.

Простой коллектор фракций.

Измеряется число капель или объем, попадающий в одну пробирку, затем пробирки передвигаются на одну таким образом, чтобы центр следующей находился под отверстием для выхода жидкости. Капли определяются с помощью фотоячейки, содержащей фотоэлемент и маленькую лампочку; каждая капля прерывает луч света и таким образом регистрируется. *1* — хроматографическая колонка; *2* — фотоячейка.

при использовании растворителя А значительно сильнее, чем другие, а в растворителе Б — гораздо слабее. Следовательно, если колонку вначале длительное время промывать растворителем А, большее количество нанесенного материала будет при этом удалено, однако основная часть вещества X останется связанной. Последующее промывание колонки растворителем Б приведет к быстрому элюированию X в относительно малом объеме.

Третий метод носит название *градиентного элюирования*, сущность которого состоит либо в изменении соотношения между двумя растворителями, либо в увеличении концентрации одного или более компонентов в растворителе (например, концентрации соли). Последний вариант более распространен при элюировании адсорбционных и ионообменных колонок. Градиенты получают с помощью устройства, схема которого изображена на рис. 8-5. Оно состоит из двух сосудов — *резервуара* и *смесительной каме-*

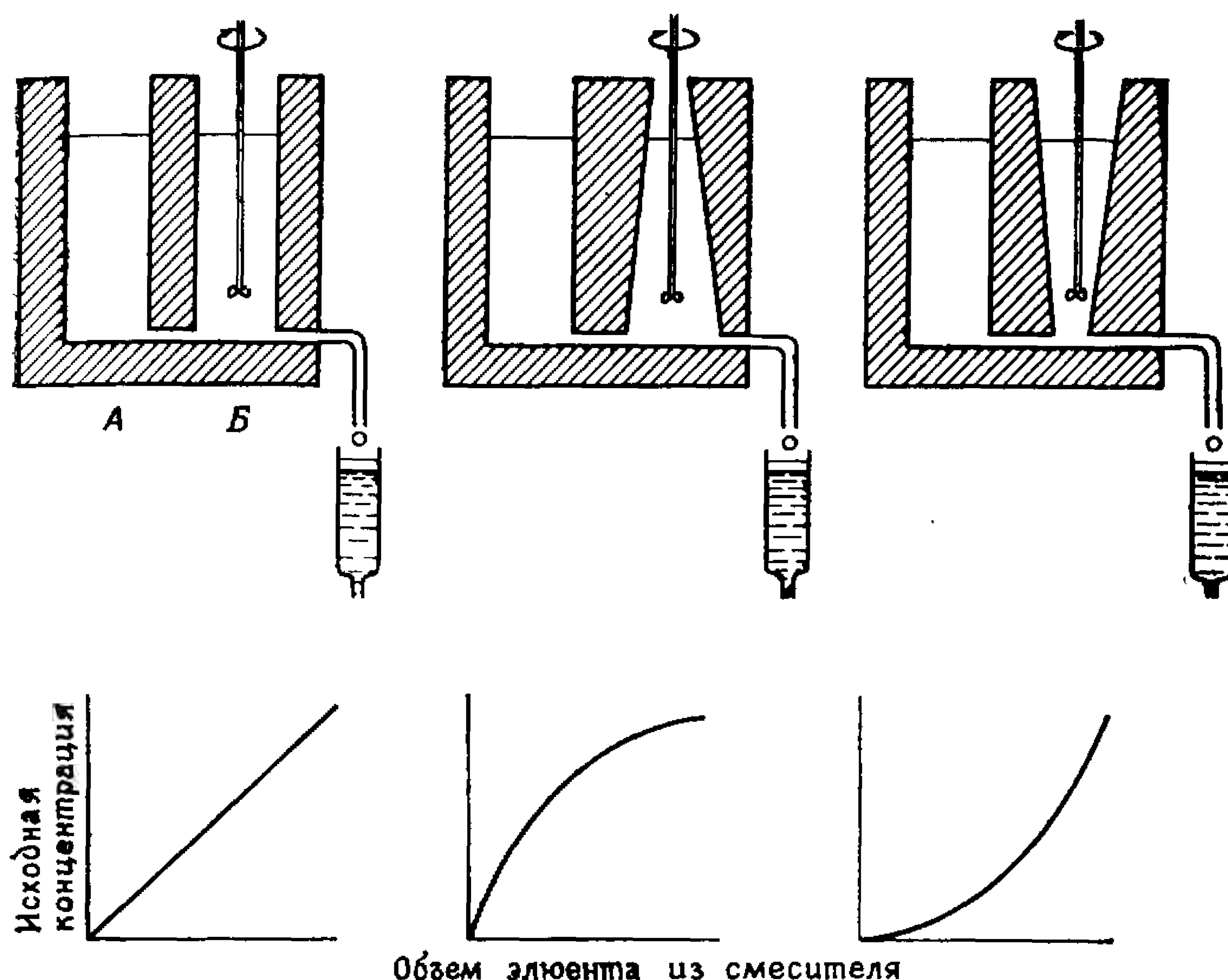


РИС. 8-5.

Три типа устройств для получения градиента и получающиеся градиенты.

При выходе жидкости из смесительной камеры жидкость из резервуара перетекает в камеру для поддержания постоянного гидростатического давления. Если две жидкости имеют одну и ту же плотность, то высота уровня в обеих камерах будет одинаковой. Если жидкость Б имеет большую плотность, чем А, уровень в Б будет ниже, чем в А. Линейный градиент получается только при равных объемах резервуара и смесительной камеры. *А* — резервуар с добавляемым растворителем; *Б* — исходная концентрация в смесительной камере.

ры, которые соединены внизу между собой. Резервуар содержит более концентрированный растворитель. Жидкость попадает в колонку из смесительной камеры. Поскольку гидростатическое давление (не обязательно высота, поскольку плотности жидкостей в двух сосудах могут отличаться) должно быть одинаковым, жидкость из резервуара постоянно перетекает в смесительную камеру. Если сосуды имеют одну и ту же форму, градиент получается линейным. Как показано на рис. 8-5, можно получить также градиент вогнутой или выпуклой формы.

Хроматография на бумаге

При распределительной хроматографии можно использовать колонки, наполненные целлюлозой. Вариантом этой методики является хроматография на бумаге, где носителем служит целлюлоза

в виде листов бумаги. Целлюлоза содержит значительное количество связанной воды даже после тщательной сушки. Распределение здесь происходит между связанной водой и проявляющим растворителем. Зачастую в качестве растворителя применяют ту же воду. Поэтому резонным будет вопрос, не является ли здесь принципом действия адсорбция? Действительно, некоторые эффекты адсорбции существуют, однако, поскольку физическая структура связанной воды сильно отличается от структуры «свободной» воды, распределение может существовать и в этом случае.

Экспериментальная методика хроматографии на бумаге

Вместе с изменением вида носителя (от колонки к бумаге) изменяется и техника эксперимента. В бумажной хроматографии нет элюента и *вещества различаются по их относительным положениям на бумаге после того, как растворитель пройдет данное расстояние.*

Небольшое количество (приблизительно 10—20 мкл) раствора смеси, которую требуется разделить, наносят в отмеченную точку на полоске или листе бумаги (рис. 8-6) и высушивают. Это пятно называется *стартовым.* Затем бумагу помещают в герметично закрытую камеру и один ее конец погружают в подходящий растворитель (подвижная фаза). Капиллярные силы обусловливают движение растворителя по бумаге, в результате чего образец на старте растворяется и его компоненты движутся в направлении движения растворителя. (Заметим, что образец должен полностью раствориться до начала движения, поэтому одним из факторов, определяющих эффективность разделения, является скорость растворения компонентов в подвижной фазе). Как только *фронт растворителя* (рис. 8-6) приблизится к противоположному концу бумаги, лист вынимают и сушат. Пятна, которые могут быть как видимыми, так и невидимыми, обнаруживают и их положение отмечают. Отношение расстояний, пройденных пятном и растворителем, обозначается R_f. Величина R_f зависит от вещества, сорта бумаги и природы растворителя.

Бумажные хроматограммы могут проявляться как в восходящем, так и в нисходящем токе растворителя. Устройства для каждого из этих вариантов изображены на рис.8-7. Получаемые при этом хроматограммы по качеству различаются лишь незначительно, поэтому выбор варианта, как правило, определяется личными приверженностями экспериментатора. Нисходящая хроматография имеет два преимущества:

1) она требует меньше времени, так как под действием силы тяжести ток растворителя ускоряется, и 2) количественное разде-

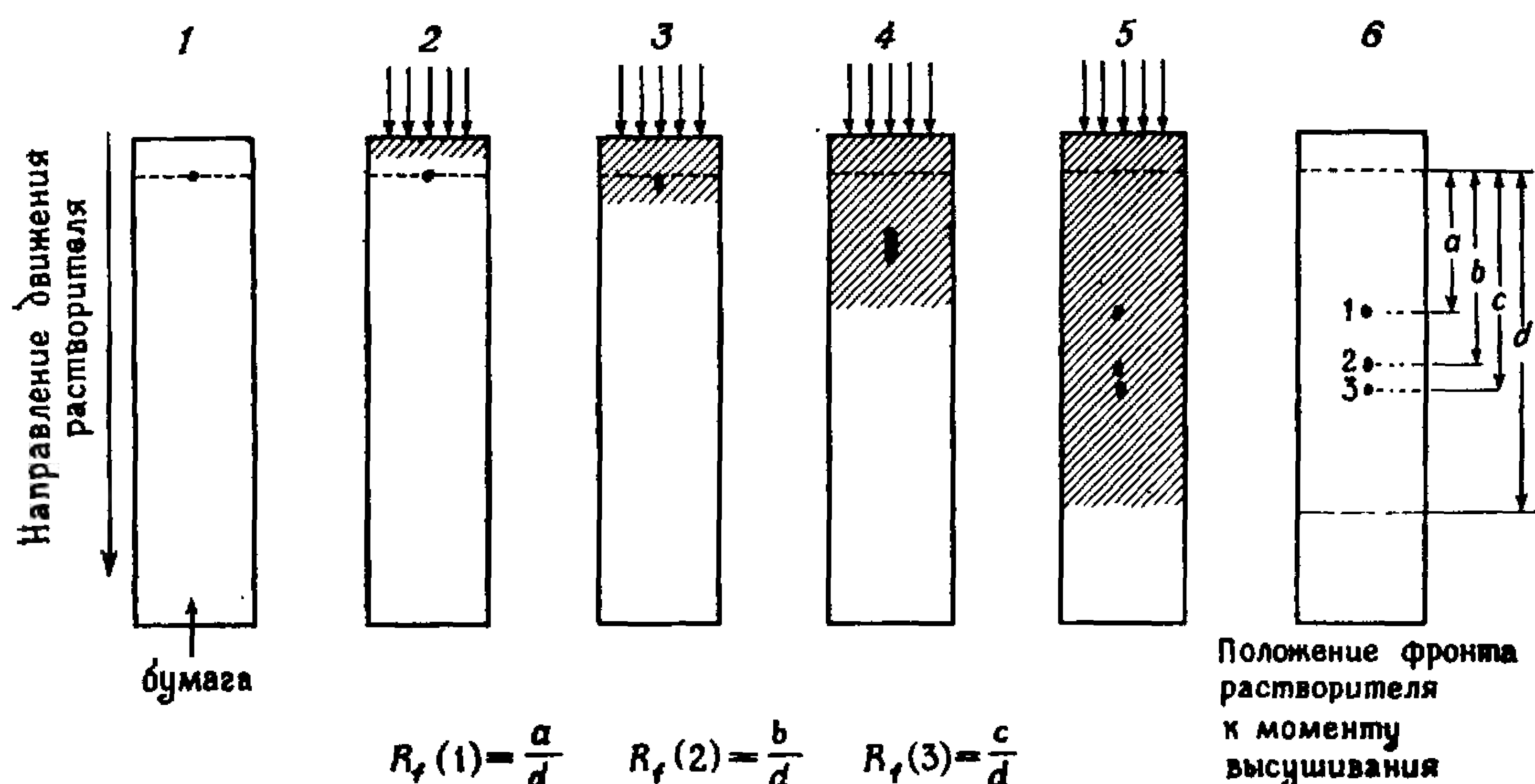


РИС. 8-6.

Нанесение образца и проявление хроматограммы на бумаге в случае смеси из трех компонентов.

1 — нанесение пробы; *2* — этот конец погружается в растворитель; *3* — фронт растворителя начинает движение; *4* — начало разделения; *5* — разделение продолжается; *6* — бумага высушивается.

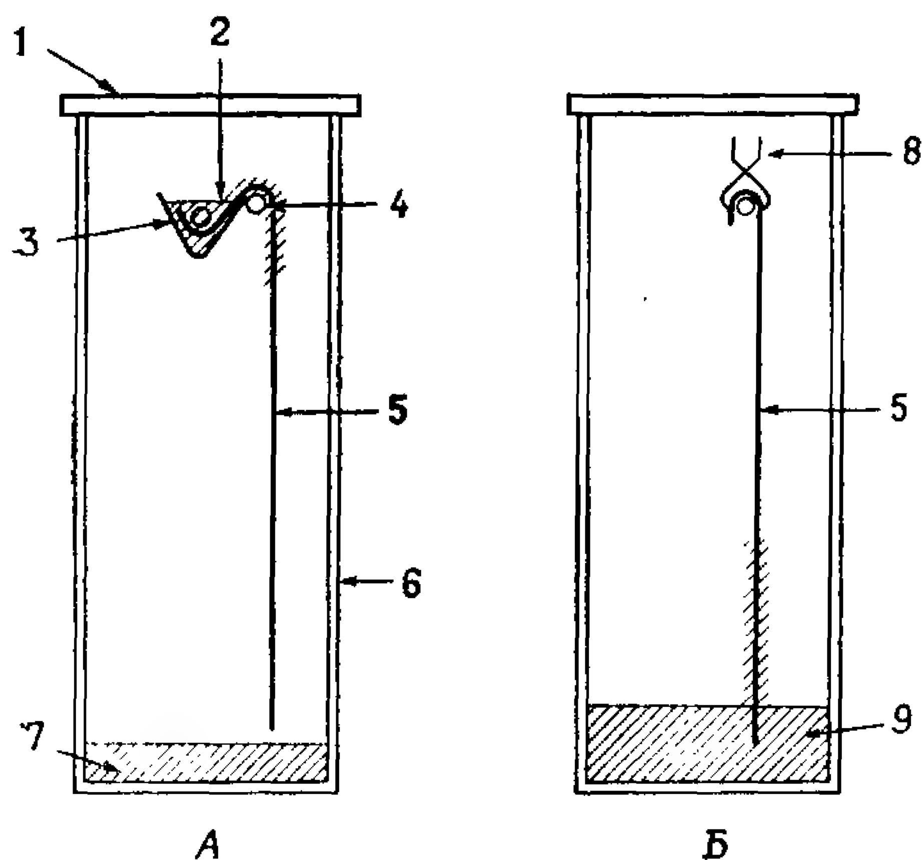


РИС. 8-7.

Устройства для нисходящей и восходящей хроматографии.

А — нисходящая; *Б* — восходящая. *1* — крышка; *2* — растворитель; *3* — лодочка с растворителем; *4* — поддерживающий стержень; *5* — бумага; *6* — стеклянная камера; *7* — избыток растворителя для поддержания влажности; *8* — зажим для удерживания бумаги; *9* — проявляющий растворитель.

ление веществ с очень малыми значениями R_f, требующих больших пробегов, можно провести при помощи перетекания растворителя. Единственным недостатком является то, что хроматографическую камеру каждый раз необходимо подготавливать с большой тщательностью, так как загрязнение или плохой контакт бумаги в месте соприкосновения со стенкой лодочки может приводить к неоднородному току и, как следствие, к образованию полос.

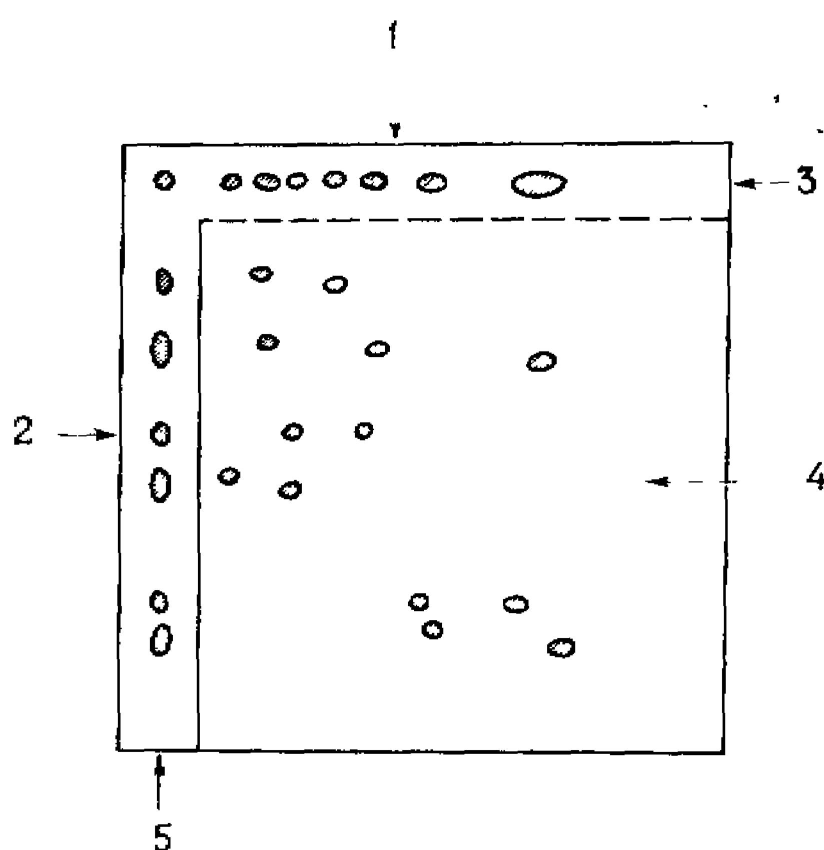


РИС. 8-8.

Двумерная хроматография на бумаге.

1 — направление движения первого растворителя; 2 — направление движения второго растворителя; 3 — разделение при применении только второго растворителя; 4 — разделение при последовательном применении обоих растворителей; 5 — разделение при применении только первого растворителя.

Нередко весьма эффективен вариант, известный как двумерная хроматография на бумаге. Метод заключается в том, что после проведения хроматографии в одном направлении бумагу высушивают и затем повторно хроматографируют под прямым углом к направлению первоначального движения растворителя с использованием другого растворителя (рис. 8-8). При этом часто происходит разделение веществ, которые не разделяются в первом растворителе.

Обнаружение и идентификация пятен

Пятна на бумажных хроматограммах могут быть обнаружены по их цвету, флуоресценции, с помощью химических реакций, которые происходят после опрыскивания бумаги различными реагентами, или по радиоактивности (рис. 8-9). Авторадиографическое обнаружение пятен с использованием рентгеновской пленки описано в гл. 6. Идентификацию обычно проводят путем сравнения с заведомыми образцами с известными величинами R_f или после элюирования. Элюирование сводится к вырезанию из бумаги зоны, содержащей пятно, с последующим промыванием ее соответствующим растворителем; элюирование обычно протекает количественно.

Пептидные карты: специальное использование бумажной хроматографии при изучении белков

Важной проблемой в молекулярной биологии является идентификация выделенного белка или установление изменения аминокислотного состава в мутантном белке. Техника «отпечатков

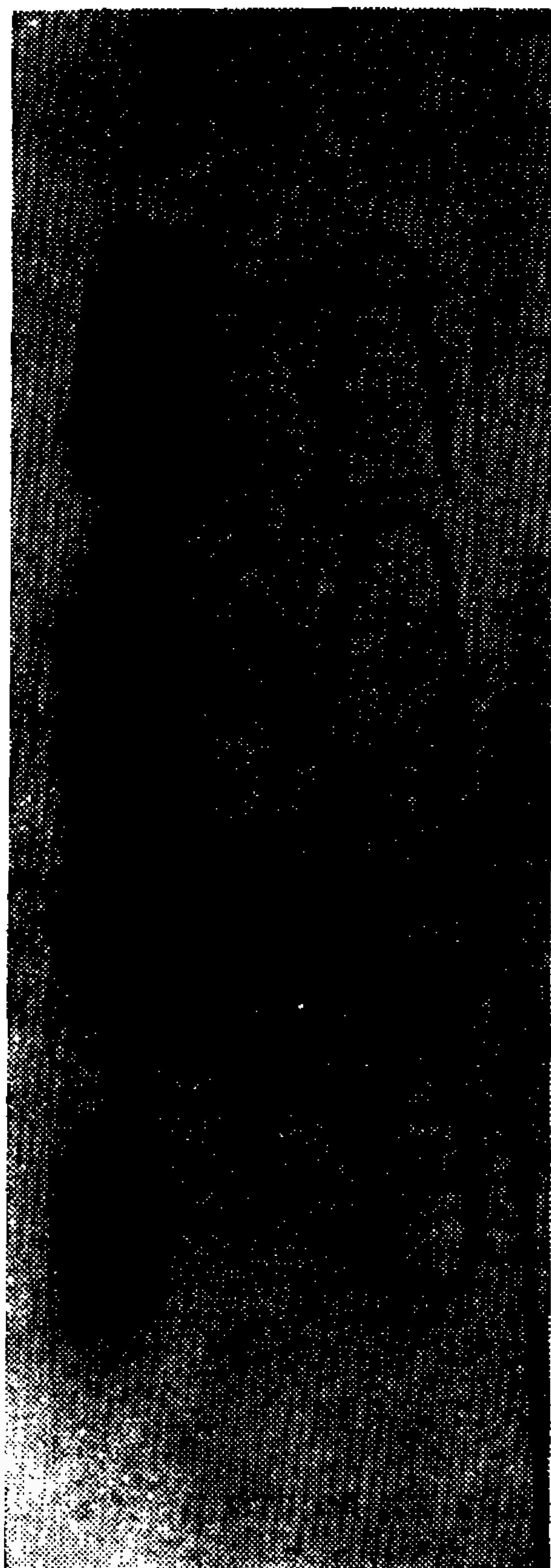


РИС. 8-9.

Хроматограмма четырех аминокислот на бумаге.

После высушивания бумагу опрыскивали нингидрином, который дает окрашенные продукты с аминокислотами. Точка показывает исходное положение пробы. Справа изображены контуры каждого пятна.

пальцев», разработанная Верноном Ингрэмом, позволяет довольно просто решить эти задачи.

Если белок подвергать расщеплению в стандартных условиях с использованием различных протеиназ (ферменты, разрывающие пептидные связи), в качестве продуктов образуются небольшие пептиды. Число и типы получающихся пептидов зависят от строения данного белка и вида использованной протеиназы (например, конкретная протеиназа может осуществлять разрыв пептидных связей только после определенной аминокислоты или класса аминокислот). Пептиды можно затем разделить с помощью двумерной хроматографии на бумаге, получая при этом распределение пятен, которое практически никогда не совпадает для различных белков. Такая пептидная карта называется «отпечатками пальцев» (рис. 8-10).

Пептидная карта мутантного белка, отличающегося от белка дикого типа только на одну аминокислоту, изображена на

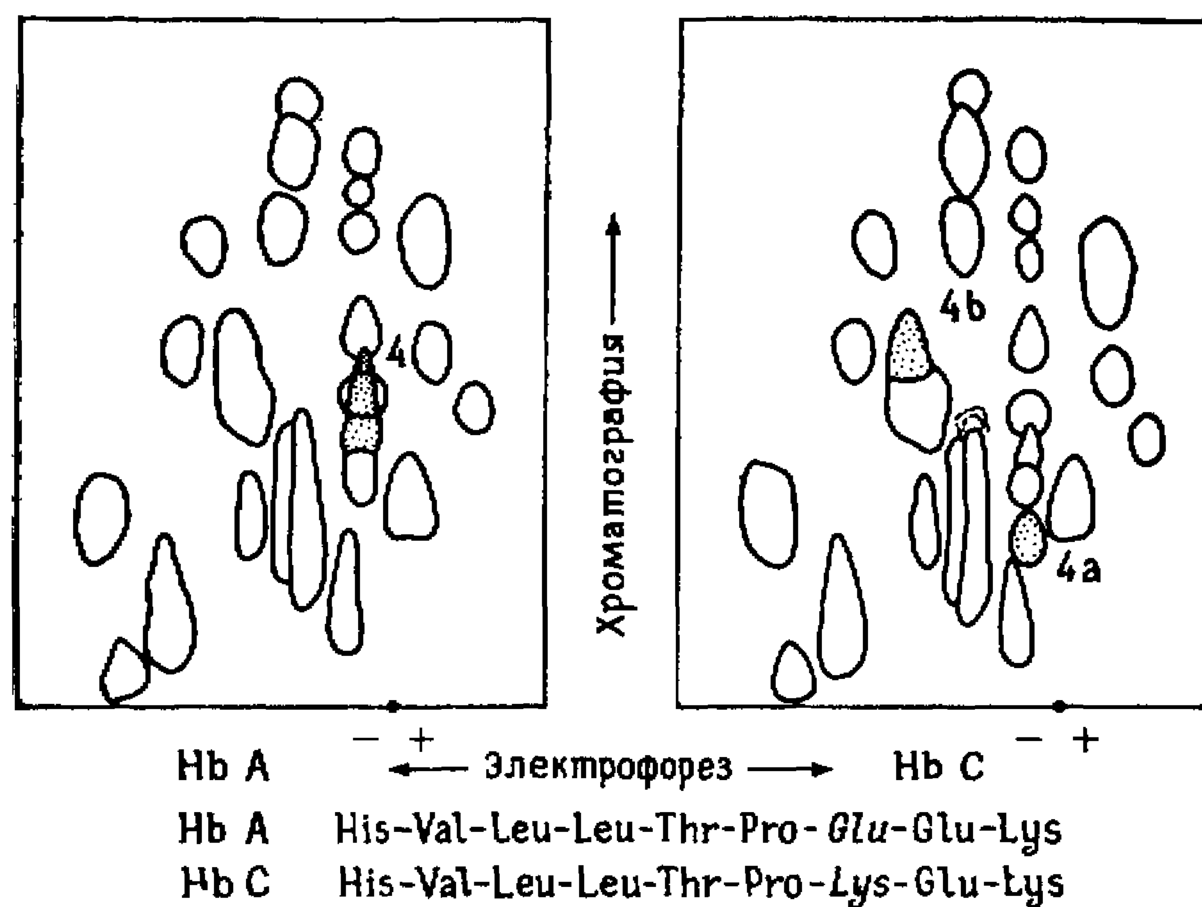


РИС. 8-10.

Пептидные карты продуктов расщепления трипсином двух различных гемоглобинов человека.

Полученные при этом пептиды вначале хроматографировали, а затем подвергали электрофорезу. Отметим, что помеченный в случае нормального гемоглобина А (Hb A) пептид отсутствует для гемоглобина С (Hb C), зато появляются два новых пептида, 4a и 4b. Последовательность аминокислот в пептидах 4, 4a и 4b при этом установлена. Превращение глутаминовой кислоты (Glu) в лизин (Lys) в измененном гемоглобине вызывает появление двух новых пептидов, поскольку трипсин не может разрывать связь между двумя остатками глутаминовой кислоты, но способен разрывать пептидную связь между лизином и глутаминовой кислотой [*Hunt J. A., Ingram V. M.*, Nature, 181, 1062—1063 (1958)].

рис. 8-10. Если замена аминокислоты не влияет на место разрыва связи протеиназой, на пептидной карте будет исчезать одно пятно, вместо которого будет появляться другое. Если замена приводит к изменению места разрыва связи, изменят свое положение сразу несколько пятен. Элюирование пятен с пептидной карты первоначального и мутантного белков и определение аминокислотной последовательности каждого из них (это можно осуществить с помощью полного ферментативного гидролиза до аминокислот с последующей хроматографией на бумаге) позволяют установить замененные аминокислоты.

Метод пептидных карт находит несколько важных приложений в молекулярной биологии, из которых следует отметить следующие:

Доказательство того, что белок А *является продуктом расщепления большего белка* Б. Если на пептидной карте белка А имеются все те же пятна, что и на пептидной карте белка Б, весьма вероятно, что белок А является частью аминокислотной последовательности белка Б. Следовательно, либо белок Б происходит из белка А путем добавления аминокислот, либо белок А получается

из белка Б при гидролизе. Как правило, изучение кинетики синтеза белков А и Б позволяет сделать выбор между этими возможностями.

Идентификация аминокислот, вводимых с помощью различных супрессорных транспортных РНК. Некоторые мутации приводят к преждевременному обрыву цепи аминокислотной последовательности в белках. Это терминирование может быть предотвращено в присутствии молекул супрессорной тРНК, которая вводит аминокислоту по месту преждевременного обрыва цепи и тем самым позволяет продолжить синтез до естественного окончания. В получающемся при этом белке заменена лишь одна аминокислота. Пептидные карты таких белков дают возможность идентифицировать аминокислоту, вводимую каждой из известных супрессорных тРНК.

Идентификация замен оснований в результате частичного мутагенеза. Так как генетический код хорошо известен, можно идентифицировать замены оснований при частичных мутациях. Предположим, например, что мутаген способен приводить к частой замене фенилаланина на изолейцин. Триплетные кодоны ДНК, соответствующие фенилаланину, представляют собой последовательности AAA и AAG, а для изолейцина — TAA, TAG и TAT. Поскольку большинство мутаций приводит к замене только одного основания, данный мутаген будет вызывать частое замещение А на Т.

Тонкослойная хроматография

Тонкослойная хроматография (ТСХ) первоначально была разработана для разделения липидов. Хотя хроматография на бумаге быстрее, чем хроматография на колонке, к недостаткам ее следует отнести то, что бумага может быть изготовлена только из материалов на основе целлюлозы, что не позволяет применять ее для разделения неполярных веществ. Тонкослойная хроматография сохраняет все преимущества хроматографии на бумаге, но при этом позволяет использовать любой материал, который можно тонко измельчить и получить затем однородный слой. Это могут быть неорганические вещества, например силикагель, окись алюминия, диатомовая земля и силикат магния, а также органические вещества, в частности целлюлоза, полиамиды и порошок полиэтилена.

В тонкослойной хроматографии неподвижной фазой служит слой (0,25—0,5 мм) сорбента, равномерно нанесенного на поверхность стеклянной или пластмассовой пластинки. Хотя в настоящее время выпускаются готовые пластинки с различными сорбентами, все же приведем методику их приготовления.

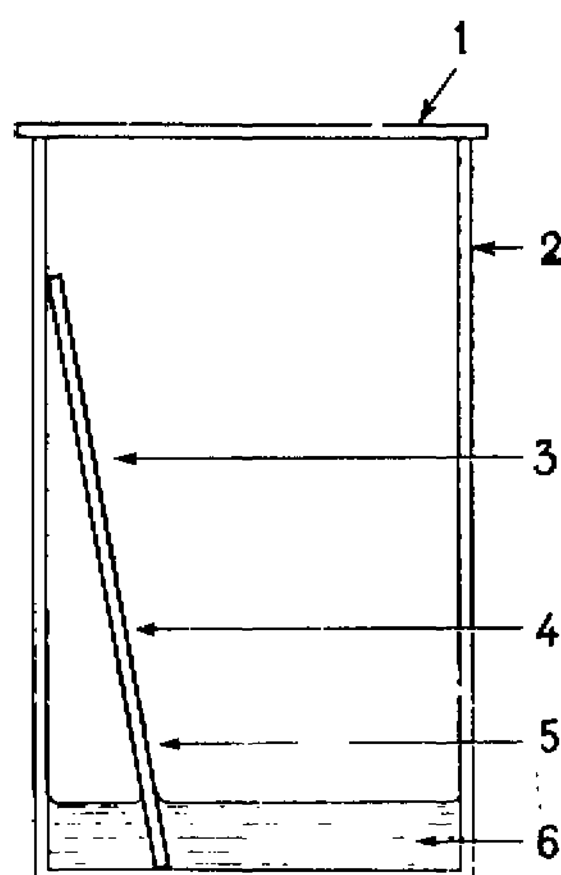


РИС. 8-11.

Типичная камера для проявления хроматографической пластинки с тонким слоем.

1 — крышка; *2* — стеклянная камера; *3* — пластинка ТСХ; *4* — сорбент; *5* — место нанесения пробы; *6* — растворитель.

Сначала получают суспензию сорбента в специфическом для него растворителе. Для очень маленьких хроматограмм предметное стекло микроскопа покрывают слоем сорбента, погружая его в суспензию. Для хроматограмм большего размера на стеклянную пластинку наносят несколько слоев узких лент по обоим краям таким образом, чтобы во время хроматографии они были вертикальными. Число слоев определяет толщину конечного слоя сорбента. Суспензию осторожно наливают на стекло, после чего выравнивают скользящим стеклянным стержнем, который захватывает при этом всю ширину пластинки. Затем пластинку высушивают и ленты удаляют. Пластинки обрабатывают так же, как при хроматографии на бумаге. Образец наносят микропипеткой и высушивают. Пластинку ТСХ помещают в камеру, содержащую растворитель, и проявляют восходящей хроматографией (рис. 8-11). После того как фронт растворителя почти достигнет верхнего края, пластинку вынимают из камеры и сушат. Для получения двумерной хроматограммы высушенную пластинку можно повторно хроматографировать под прямым углом в другом растворителе. Положение пятен, как и при хроматографии на бумаге, определяют по окраске, по флуоресценции или при опрыскивании различными реагентами, которые реагируют с веществами в пятне с образованием окрашенных продуктов. Обычно используют следующие реагенты: нингидрин для аминокислот, родамин В для липидов, хлорид сурьмы для стероидов и терпенов, серную кислоту с последующим нагреванием практически для всех органических соединений (происходит обугливание), перманганат калия в серной кислоте для углеводородов, анисовый альдегид в серной кислоте для углеводов, пары брома для олефинов и т. д. Вещества можно элюировать путем соскребания

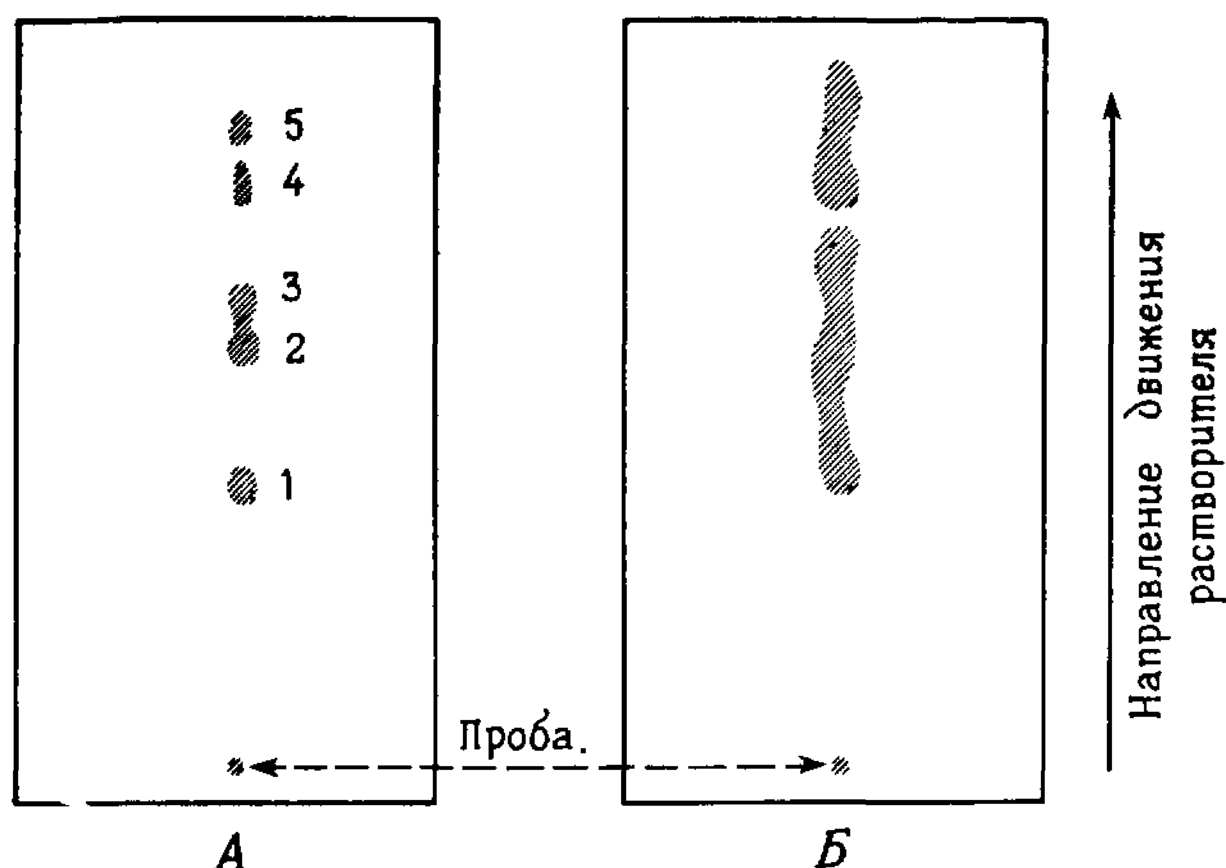


РИС. 8-12.

Сравнение разделения с помощью тонкослойной хроматографии (*А*) и хроматографии на бумаге (*Б*) аденина (*1*), аденозина (*2*), гипоксантина (*3*), инозина (*4*) и уридина (*5*) в обоих случаях на целлюлозе при проявлении водой.

сорбента и промывания полученного порошка подходящим растворителем. Типичная тонкослойная хроматограмма показана на рис. 8-12.

Тонкослойная хроматография очень широко распространена, так как обладает рядом преимуществ перед хроматографией на бумаге и колоночной хроматографией, к числу которых следует отнести бóльшую разрешающую способность, так как пятна здесь намного меньше, бóльшую скорость разделения, более широкий выбор материалов для сорбентов, простое обнаружение пятен и легкость выделения веществ с хроматограмм.

Бóльшую разрешающую способность тонкослойной хроматографии обеспечивают два фактора: во-первых, отношение массы растворенных веществ к массе сорбента составляет от $1:10^3$ до $1:10^4$, тогда как в колоночной хроматографии это отношение обычно равно 1 : 50; во-вторых, соотношение поверхность/объем очень велико, поскольку частицы сорбента могут быть очень мелкими (менее 0,1 мм), что позволяет для данного объема сорбента получить большую активную поверхность. Такие маленькие частицы не применяются в колоночной хроматографии, поскольку под действием силы тяжести они спрессовываются, что приводит к уменьшению скорости движения жидкости, а это крайне нежелательно, так как при очень малой скорости потока возрастает размывание зон за счет диффузии.

При хроматографии на бумаге применяют только целлюлозу и те немногие продукты, из которых можно получать бумагу.

Тонкослойная хроматография лишена этого недостатка. Кроме того, тонкослойная хроматография по сравнению с хроматографией на бумаге более быстрый процесс и дает лучшее разрешение. Волокнистая структура бумаги и связанные с этим капиллярные явления приводят к увеличению размера пятен. Материалы, используемые в тонкослойной хроматографии, можно измельчать с тем, чтобы устранить волокна. В случае меньших пятен время пробега можно уменьшить, так как для разделения пятен здесь требуется меньшее время. Зачастую тонкослойная хроматография требует всего лишь нескольких минут. Это является серьезным преимуществом в том случае, когда неизвестен оптимальный растворитель для разделения и в течение одного дня требуется проверить большое число систем растворителей.

Меньший размер пятен означает также, что концентрация вещества в пятнах больше; таким образом, для обнаружения требуется меньшее количество вещества. Действительно, для многих веществ тонкослойная хроматография является в 50—100 раз более чувствительным методом, чем хроматография на бумаге, причем можно обнаружить вещество в количестве до 1 нмоля. Обнаруживаемое количество аминокислот примерно в 10 раз меньше, чем в случае хроматографии на бумаге, что имеет большую ценность в случае, когда имеется лишь небольшое количество образца очищенного белка для проведения аминокислотного или пептидного анализа. Для тонкослойной хроматографии нуклеотидов требуется в 100 раз меньшее количество, чем для их хроматографии на бумаге.

Газожидкостная хроматография

До сих пор речь шла о распределительной хроматографии с жидкой подвижной фазой и жидкой неподвижной фазой, которая иммобилизована путем адсорбции на твердом носителе. В газожидкостной хроматографии (ГЖХ) подвижной фазой служит газ, а неподвижной фазой также является жидкость, которая либо нанесена на внутреннюю поверхность колонки *(капиллярная колонка)*, либо на твердый носитель, например диатомовую землю, порошок тефлона или мелкие стеклянные шарики *(насадочная колонка)*. Жидкая фаза для нанесения предварительно растворяется в летучем растворителе, таком, как эфир. Например, мелкие стеклянные шарики погружают в раствор полиэтиленгликоля в эфире и после того, как эфир улетучится, каждый шарик оказывается покрытым слоем полиэтиленгликоля. При температуре, которая обычно используется в газожидкостной хроматографии, полиэтиленгликоль плавится и остается на шариках в виде жидкой пленки. Образец, представляющий собой вещество, способ-

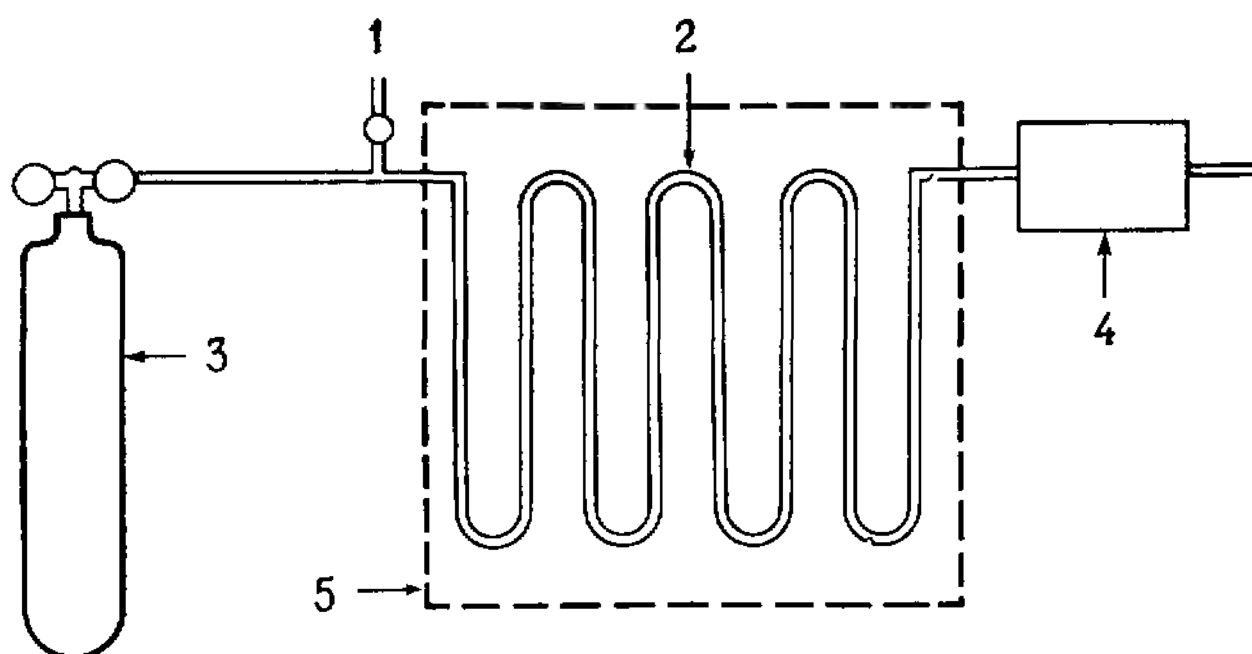


РИС. 8-13.

Схема аппарата для газожидкостной хроматографии.

1 — ввод образца; *2* — колонка; *3* — газ-носитель; *4* — детектор; *5* — термостат.

ное испаряться без разложения, вводят в жидком состоянии с инертным газом, например гелием, аргоном или азотом, и затем нагревают. Образующаяся газовая смесь проходит через колонку по схеме, показанной на рис. 8-13. Насадочные колонки обычно имеют диаметр около 0,5 см и длину от 1 до 20 м. Длина капиллярных колонок обычно колеблется в пределах от 30 до 100 м. Для достижения особенно хорошего разрешения применяются капиллярные колонки до 2 км в длину. Испаренные вещества постоянно перераспределяются между подвижной газовой фазой и неподвижной жидкой фазой в соответствии с их коэффициентами распределения, в результате чего и происходит хроматографирование. На конце колонки находится подходящий детектор.

Обнаружение веществ в элюате

В практике аналитической хроматографии обычно применяют три типа детекторов: катарометр, или детектор по теплопроводности (чувствительность около 10 мкг), аргоновый ионизационный детектор (чувствительность до 10^{-5} мкг) и пламенно-ионизационный детектор (чувствительность около 10^{-5} мкг). Работа катарометра основана на том, что электрическое сопротивление проволоки зависит от температуры. Если нагретую проволоку поместить в ток газа с постоянной скоростью, проволока будет охлаждаться до температуры, определяемой газовым потоком и теплопроводностью газа. Таким образом, при постоянной скорости потока температура, а следовательно, и сопротивление являются характеристическими для данного газа. Если состав газа изменяется, происходит изменение и теплопроводности газа, а значит, и сопротивления. Эти изменения регистрируются самописцем как функция времени.

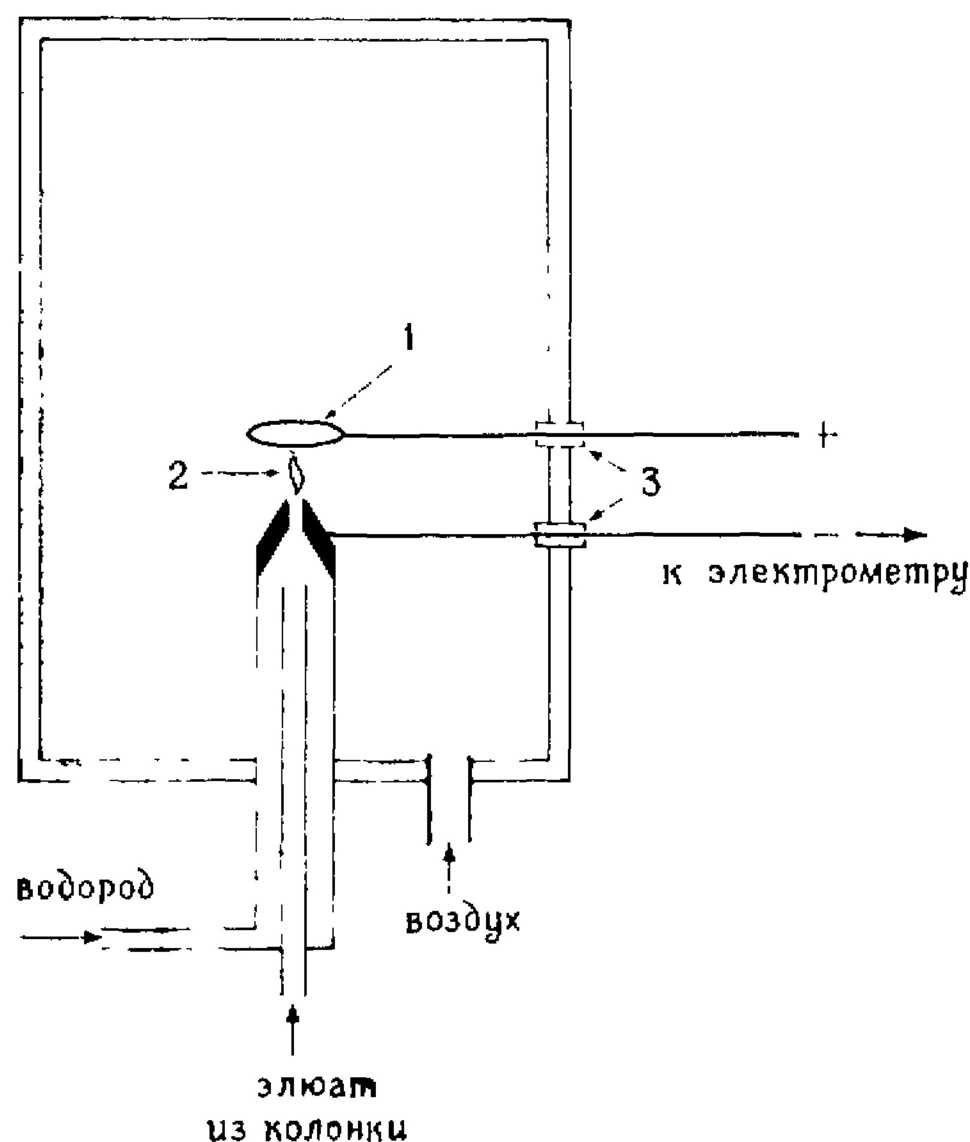


РИС. 8-14.

Пламено-ионизационный детектор.

1 — проволочная петля; *2* — пламя; *3* — изолятор.

При использовании аргонового ионизационного детектора газ-носитель, аргон, из колонки поступает в камеру детектора, сходную по устройству с трубкой Гейгера — Мюллера, и ионизируется под действием бомбардирующих его β-частиц. Как уже говорилось в гл. 5, при прохождении положительно заряженных ионов аргона вблизи катода они приобретают электрон и становятся нейтральными. В результате этой рекомбинации образуется рентгеновское излучение, приводящее к ионизации многих атомов аргона. Это вызывает самопроизвольную постоянную ионизацию, в результате чего в трубке Гейгера — Мюллера получается постоянный ток. Если в потоке газа присутствует вещество с потенциалом ионизации, меньшим, чем у аргона, оно взаимодействует с ионами аргона с переносом электрона. В результате атомы вещества приобретают положительный заряд. При подходе к катоду они получают электрон и также становятся нейтральными. Однако в случае большинства органических соединений избыточная энергия рекомбинации не приводит к получению рентгеновского излучения, а вызывает разрывы химических связей. Таким образом, если присутствует такое вещество, ток между электродами уменьшается. Ток в процессе хроматографирования измеряется и регистрируется как функция времени. При этом необходимо предварительно провести калибровку, как и в случае детектора по теплопроводности. Чувствительность детектора этого типа составляет 0,1 мкг.

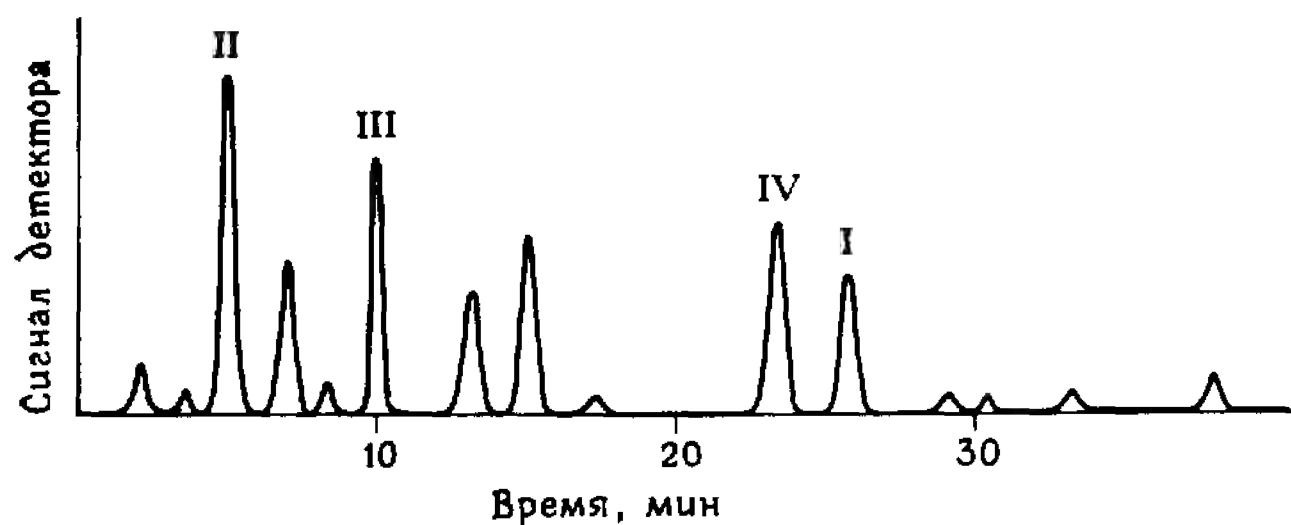


РИС. 8-15.

Газовая хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот, выделенных из печени крысы, которой вводили 25 ммоля глюкозы и 2 ммоля арахидоната (*I*). Пентадеканоат (*II*) прибавляли перед гомогенизацией и экстракцией печени, чтобы получить стандарт для определения количеств жирных кислот в первоначальном образце; метилгептадеканоат (*III*) прибавляли к смеси перед введением в колонку газового хроматографа для определения вводимого количества. Использовали пламенно-ионизационный детектор. Пики соответствуют нормальным компонентам печени крысы; пик *IV* появляется, если в пище отсутствуют основные жирные кислоты. (Любезно предоставил Джон Левенштейн.)

Схема пламенно-ионизационного детектора показана на рис. 8-14. Водород горит в воздухе в присутствии элюата с колонки. При этом любое углеродсодержащее вещество сгорает с образованием двуокиси углерода. По не совсем ясным причинам образуются электроны и отрицательно заряженные ионы, которые регистрируются в виде тока, который затем преобразуется в разность потенциалов. Диапазон линейности детектора находится в пределах от 0,01 мкг до 5 мг, причем определяются только атомы углерода. Типичная газовая хроматограмма показана на рис. 8-15.

Идентификация компонентов по сигналам детектора

Каждый детектор регистрирует количество вещества, выходящее с колонки, как функцию времени. Однако при этом отсутствует прямое указание на вещество, которое фиксируется в виде данного пика, а также на его количество. Существует ряд методов идентификации пиков. Например, если вещество заведомо присутствует в смеси и целью хроматографии является определение его количества, пик может быть идентифицирован с помощью анализа дополнительного образца, содержащего добавочное количество известного вещества в данной смеси, после еще одного хрома-

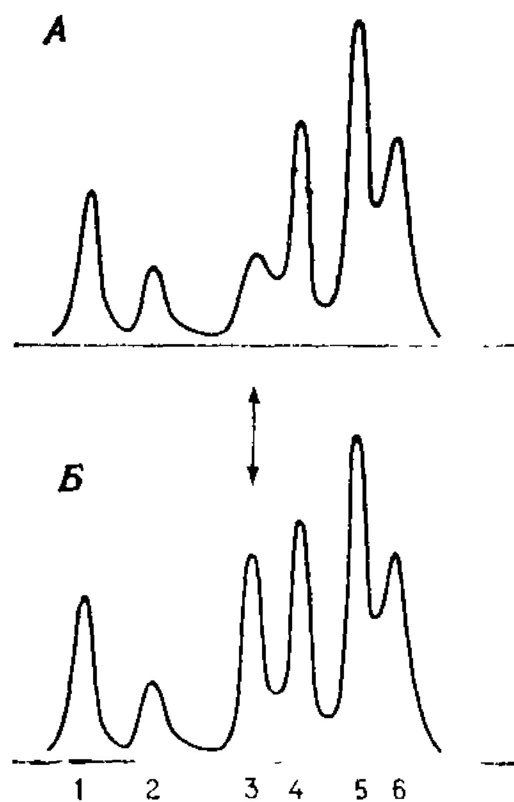


РИС. 8-16.

Идентификация пика на газовой хроматограмме путем добавления известного вещества.

Смесь содержит фенол (*1*), *о*-крезол (*2*), *п*-крезол (*3*), *м*-крезол (*4*), 2,4-диметилфенол (*5*) и 2,5-диметилфенол (*6*). Образец смеси подвергали анализу (*А*), после чего к смеси добавляли *п*-крезол и смесь анализировали снова (*Б*). Отметим, что в результате пик *3* увеличился.

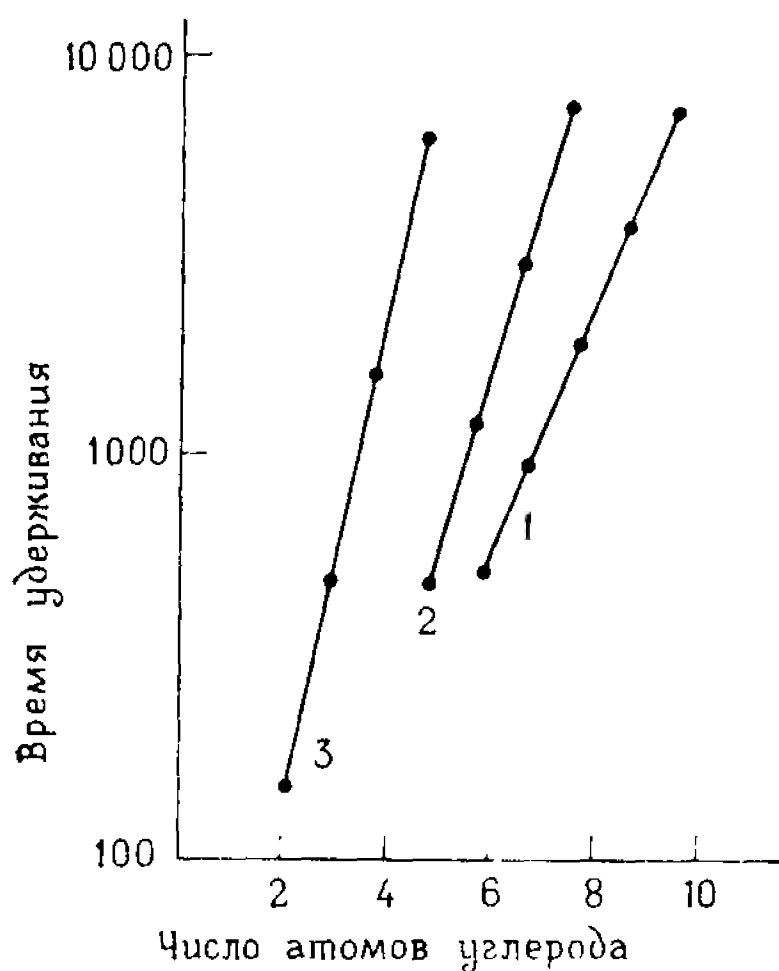


РИС. 8-17.

Графики, показывающие, что логарифм времени удерживания линейно зависит от числа атомов углерода для соединений гомологического ряда.

1 — пропионаты; *2* — ацетаты; *3* — нормальные спирты.

тографирования. Если известное вещество соответствует одному из компонентов смеси, то величина пика этого компонента станет большей (рис. 8-16). Если имеются пики для ряда гомологичных веществ (например, этиловые эфиры жирных кислот), можно составить зависимость логарифма времени удерживания (т. е. времени между введением образца и выходом его из колонки) от числа атомов углерода (рис. 8-17), причем в таких случаях зависимость обычно представляет собой прямую. Добавление одного или двух стандартов из гомологичной серии позволяет провести калибровку хроматограммы. Естественно, что такой метод применим только в том случае, когда заранее известно, что все компоненты смеси являются гомологами.

Идентификация неизвестных веществ представляет бо́льшие трудности, причем здесь нет какого-либо общего метода. Иногда элюируемый газ пропускают через контрольный раствор, который дает специфическую окраску с различными функциональными группами (например, альдегидной, спиртовой и т. д.). Другой метод предусматривает химическую модификацию и повторное хроматографирование с различными стандартами или анализ с использованием других физических методов. Это часто делают в тех случаях, когда существуют некоторые предположения по поводу неизвестных веществ. Естественно, что при идентификации веществ всегда необходимо применять детектор, не вызывающий деструкции (например, катарометр).

Количественное определение веществ в пиках также не является стандартной процедурой. Для каждого вещества его количество пропорционально площади соответствующего пика. Однако константы пропорциональности для различных веществ не совпадают. Следовательно, первой задачей является надежная идентификация вещества, соответствующего данному пику. Далее для количественного определения следует построить калибровочный график, для чего хроматографируют различные количества данного вещества и устанавливают зависимость между относительной площадью пика и количеством вещества.

Достоинства газожидкостной хроматографии

Газожидкостная хроматография обладает высокой разрешающей способностью. При этом метод чрезвычайно чувствителен и требует мало времени. Достаточно сказать, что многие вещества можно определять в количестве 10^{-12} г. Поскольку скорость проявления хроматограмм зависит от скорости диффузии между подвижной и неподвижной фазами, а скорость диффузии газов много больше, чем скорость диффузии жидкостей, скорость разделения в газовой хроматографии примерно в тысячу раз больше, чем в жидкостной. Таким образом, на разделение зачастую требуется менее минуты. Более того, газожидкостную хроматографию можно использовать в препаративных целях, если применять детекторы, не вызывающие деструкции веществ, и конденсировать вещества на выходе из колонки. Большие препаративные хроматографы позволяют получать высокоочищенные вещества в количестве граммов.

Применение газожидкостной хроматографии

Газожидкостную хроматографию можно применять для любых веществ, способных испаряться (сюда относятся тысячи органических соединений). Нелетучие вещества также могут быть про-

анализированы после превращения их в летучие производные путем окисления, ацилирования, алкирования и т. д.

В биологических образцах чаще всего требуется разделение спиртов, сложных эфиров, жирных кислот и аминов. Это особенно важно при изучении промежуточных стадий метаболизма и исследовании механизмов ферментативных реакций. Метод широко применяется для идентификации компонентов душистых веществ и вин и для обнаружения пестицидов в биологическом материале.

Газожидкостная хроматография также играет важную роль в органическом анализе. В частности, углерод и водород можно определять с точностью 0,5 и 0,1% соответственно, сжигая образцы в токе сухого кислорода, не содержащего примесей CO_2 и H_2O, и определяя количества CO_2 и H_2O. Можно также определять и функциональные группы. Например, алкоксигруппы определяют путем иодирования с образованием иодистого алкила, который затем легко идентифицировать. Положение двойной связи легко определить с помощью расщепления связи озонолизом или окислением с последующей хроматографией продуктов.

Гель-проникающая хроматография

Гель-проникающая хроматография (ее иногда называют молекулярно-ситовой хроматографией) представляет собой особый вид распределительной хроматографии, где разделение основано на размерах молекул разделяемых веществ.

Теоретические основы гель-проникающей хроматографии

Основа гель-проникающей хроматографии достаточно проста. Колонка изготавливается из мелких частиц инертного материала, который содержит маленькие поры. Если раствор, содержащий молекулы различной величины, пропускать через такую колонку (рис. 8-18), молекулы, размер которых превышает размер пор, будут двигаться только в пространстве между частицами и поэтому не будут задерживаться материалом колонки. Однако молекулы, размеры которых меньше размера пор, диффундируют в частицы и обратно, причем вероятность этого повышается с уменьшением их размера, т. е. движение молекул по колонке замедляется. Если материал частиц в колонке (гель) не адсорбирует молекул, вероятность проникновения молекул в поры является основным фактором, определяющим скорость движения че-

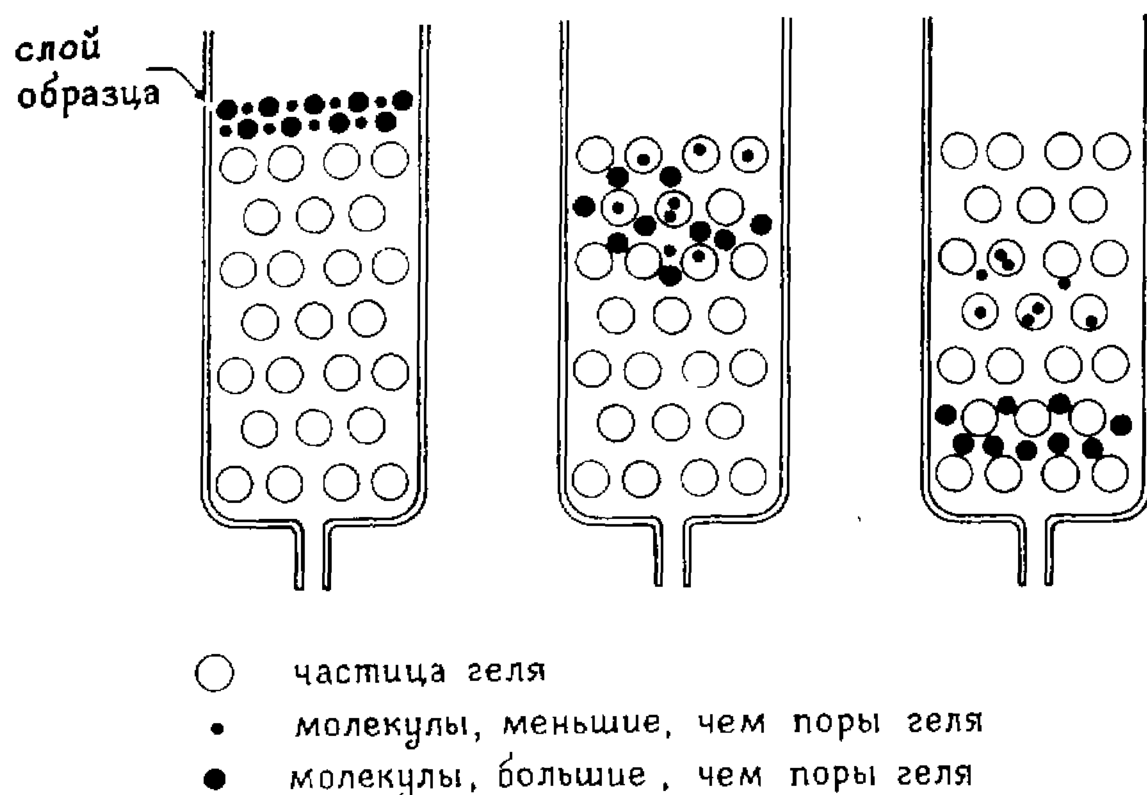


РИС. 8-18.

Разделение двух типов молекул при прохождении через колонку, содержащую частицы пористого геля. Молекулы, размеры которых больше пор, двигаются быстрее тех молекул, размеры которых меньше, поскольку последние входят в поры и выходят из них.

рез колонку. Следовательно, молекулы элюируются с такой колонки в порядке уменьшения их размера или, если форма их относительно сходна (например, глобулярная или линейная), в порядке уменьшения молекулярной массы.

При более подробном анализе механизма гель-проникающей хроматографии становится ясно, что такой стерический эффект, хотя и играет существенную роль, тем не менее не может дать объяснения хроматографического поведения всех молекул. Другой важной причиной является заряд молекул. Известно, что при очень низкой ионной силе маленькие молекулы с высоким зарядом не входят в поры даже тогда, когда их размеры это позволяют. Это явление, вероятно, можно объяснить влиянием электростатического отталкивания между молекулами, что ограничивает число молекул в каждой поре. При очень низкой ионной силе для некоторых типов геля характерно также проявление явных адсорбционных эффектов.

Материалы для гель-проникающей хроматографии

Гель представляет собой трехмерную сетку, обычно со статистически расположенными узлами. Гели, используемые в качестве молекулярных сит, — это сшитые полимеры, которые в общем инертны, не связываются и не реагируют с анализируемыми веществами и не имеют заряда. Пространство внутри геля заполне-

но жидкостью, причем эта жидкость занимает бо́льшую часть объема геля.

Обычно применяются гели на основе декстрана, агарозы и полиакриламида. Все они используются для водных растворов.

Декстран представляет собой полисахарид, построенный из остатков глюкозы, получаемый при выращивании микроорганизма *Leuconostoc mesenteroides* на сахарозе. Степень сшивания декстрана может быть различной, что позволяет получать материал с различным размером пор. Выпускается он в виде сухих гранул нескольких стандартных размеров, которые набухают при добавлении воды. При набухании поры заполняются жидкостью, которая используется в качестве элюента. Такой материал известен под названием «сефадекс» (Pharmacia Fine Chemicals, Inc.).

Агароза получается из некоторых морских водорослей и представляет собой линейный полимер из чередующихся остатков D-галактозы и 3,6-ангидро-L-галактозы. Характерной особенностью агарозы служит способность образовывать прочный гель, который стабилизирован водородными связями без поперечных связей. Агароза растворяется в кипящей воде и образует гель при охлаждении. Концентрация полисахарида в геле определяет размер пор, которые больше, чем в сефадексе. Гель агарозы полезен при анализе или разделении высокомолекулярных глобулярных белков или длинных линейных молекул, таких, как ДНК. Агарозу почти не используют в виде сплошного геля, так как скорость тока жидкости через него крайне низка; поэтому ее, как правило, выпускают в виде влажных гранул под названием «сефароза» (Pharmacia Fine Chemicals, Inc.) и биогель A (Bio-Rad Laboratories).

Полиакриламидные гели получают при сшивании молекул акриламида с N, N′-метилен-*бис*-акриламидом. Здесь размер пор также определяется степенью сшивания. Эти гели отличаются от гелей декстрана и агарозы числом полярных карбоксиамидных групп на некоторых атомах углерода, однако их разделительные свойства очень схожи с гелем декстрана. Полиакриламидные гели, известные как биогель P (Bio-Rad Laboratories), применяются для тех же целей, что и декстран, хотя и несколько реже. Преимущество их перед декстранами состоит в возможности получить более широкий спектр размеров пор.

Недавно для водных растворов начали использовать стеклянные шарики с пористой поверхностью (биоглас, Bio-Rad Laboratories), однако данные по их применению пока еще слишком ограниченны.

Описанные выше гели набухают в воде и некоторых органических растворителях: этиленгликоле, формамиде и диметилсульфоксиде. Однако набухания не происходит в чистых спиртах, углеводородах и большинстве полярных и неполярных органиче-

ских растворителей. Известно, что такие вещества, как липиды, стероиды и некоторые витамины, легче растворяются именно в таких растворителях. Для работы в этих условиях разработаны специальные гели. Для гель-проникающей хроматографии в неполярных органических растворителях хорошо подходит сшитый полистирол (стирагель, Dow Chemical Co; биобедс S, Bio-Rad Laboratories). При использовании полярных органических растворителей хорошим материалом служит метилированный сефадекс. Оксипропильное производное сшитого декстрана (сефадекс LH) можно применять для работы как в полярных, так и неполярных растворителях.

ТАБЛИЦА 8-2

Носители, используемые в гель-проникающей хроматографии

Исходный продукт и коммерческое название	Молекулярная масса разделяемых веществ[a]
Декстран	
Сефадекс G-10	7000
Сефадекс G-25	1000—5000
Сефадекс G-75	3000—70 000
Сефадекс G-200	5000—800 000
Полиакриламид	
Биогель P-2	200—2000
Биогель P-6	1000—6000
Биогель P-150	15 000—150 000
Биогель P-300	60 000—400 000
Агароза	
Сефароза 2B	$2\cdot10^6$—$25\cdot10^6$
Сефароза 4B	$3\cdot10^5$—$3\cdot10^6$
Биогель A-0,5 M	30 000—500 000
Биогель A-15 M	30 000—$15\cdot10^6$
Биогель A-150 M	$5\cdot10^6$—$150\cdot10^6$

[a] Глобулярные белки или полинуклеотиды.

Пределы молекулярных масс, в которых происходит фракционирование, в первую очередь определяются размерами пор. В табл. 8-2 приведены соответствующие данные для наиболее употребительных материалов. Таким образом можно без труда выбрать требуемый гель. Однако гранулы геля могут быть следующих размеров: крупные, средние, тонкие и супертонкие. Есть

правило, согласно которому с увеличением размера гранул ускоряется ток элюента и ухудшается разрешение. Следовательно, супертонкие гранулы применяются в тех случаях, когда требуется максимальное разрешение, например для аналитических целей. Тонкие гранулы рекомендуются для препаративных задач, если колонка не слишком длинная, а скорость тока имеет не слишком большое значение. Более крупные гранулы применяются для разделений в больших масштабах, когда разрешение имеет меньшее значение, чем время разделения.

Достоинства гель-проникающей хроматографии

Гель-проникающая хроматография незаменима для разделения молекул, отличающихся по молекулярным массам, по следующим причинам:

1. Хроматографическое поведение практически всех веществ в геле не зависит от температуры, pH, ионной силы и состава буфера, разделение можно проводить почти в любых условиях. Для очень лабильных веществ (например, ферментов) это означает возможность соблюдения условий максимальной стабильности.

2. Так как адсорбция практически отсутствует, очень лабильные вещества не изменяются в результате хроматографии. Это очень существенно, так как некоторые ферменты инактивируются или изменяют свои свойства при связывании с адсорбирующей поверхностью или ионообменной смолой.

3. Уширение зон в гель-проникающей хроматографии меньшее, чем в других хроматографических методах (причины этого неизвестны).

4. Объем элюирования находится в прямой зависимости от молекулярной массы.

Определение молекулярной массы

Для различных типов гелей установлено, что зависимость параметра K от $\lg M$ (M — молекулярная масса) представляет собой прямую линию для всех молекул, исключая очень большие и очень маленькие (рис. 8-19). Исключение могут составлять низкомолекулярные ароматические соединения, молекулы с большим зарядом при низкой ионной силе ($\ll 0{,}01$) и некоторые линейные молекулы, такие, как коллаген и фибриноген. Параметр K определяется как $(V_e - V_0)/V_s$, где V_e — объем растворителя, требуемый для элюирования интересующего соединения, V_0 — нулевой или холостой объем, необходимый для элюирования соединения, которое не проникает в неподвижную фазу, и V_s — объем неподвижной фазы. В гель-проникающей хроматографии V_s — объем геля (бóльшую часть которого составляют поры), а величине V_0

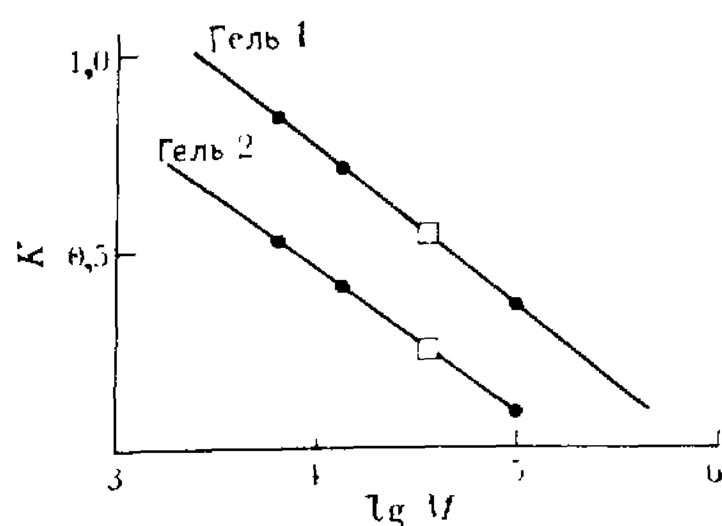


РИС. 8-19.

Типичные результаты, полученные при определении приблизительной молекулярной массы белков с помощью гель-проникающей хроматографии, с использованием трех известных белков (черные кружки) и двух различных типов геля (гель 1 и гель 2). Квадратиками обозначен образец (определение K описано в тексте). Использование двух различных типов гелей бывает полезным, так как обычно, если поведение белка не отвечает зависимости K—lg M (вследствие своей формы), измеренное значение M будет различным для двух гелей.

отвечает объем, необходимый для элюирования вещества, которое совершенно не проникает в поры; для определения V_0 обычно через колонку пропускают вещество с исключительно высокой молекулярной массой — голубой декстран. V_s измеряют как разность между V_t и V_0, где V_t — общий объем колонки.

Для глобулярных белков и многих углеводов эта методика дает очень надежные результаты при использовании различных типов сефадекса и биогеля Р. Очень важно, что величину M можно определить на нефракционированных экстрактах клеток при условии, что анализируемый белок известен; почти все другие методы требуют достаточно очищенных препаратов. Таким образом, для определения M достаточно пропустить через колонку несколько молекул с известной молекулярной массой, по полученным данным построить прямую линию, после чего M образца можно определить интерполяцией. Точность такого определения составляет около 10%. Некоторые более точные методики определения молекулярной массы будут обсуждаться в разделе, посвященном тонкослойной гель-проникающей хроматографии.

Определение распределения по молекулярным массам часто дает ценную характеристику природных и синтетических полимеров. Напомним, что использование для этой цели физических методов, таких, как центрифугирование, требует относительно чистого материала. Применение же гель-проникающей хроматографии позволяет определить распределение простым измерением количества вещества как функции элюируемого объема. Для этого строят калибровочную прямую и проводят простую математическую коррекцию уширения зон.

Приложения гель-проникающей хроматографии

Гель-проникающая хроматография в основном служит для разделения и находит широкое применение для очистки белков, в частности ферментов, а также нуклеиновых кислот. Гели на основе декстрана особенно ценны при работе с нестабильными белками, что уже отмечалось выше. В препаративных целях используются как декстраны, так и полиакриламиды, причем объем геля может варьировать от нескольких миллилитров до нескольких литров. В промышленности находят применение колонки объемом 1000 л. Использование геля агарозы дает возможность с успехом фракционировать и очищать различные виды РНК и вирусов.

При очистке больших количеств макромолекул, где требуются различные виды фракционирования, часто бывает необходимо удалить соли, сменить буфер, сконцентрировать вещество, удалить вещества типа фенола и детергенты, используемые при выделении и очистке нуклеиновых кислот. Эти процедуры часто занимают много времени (например, осаждение или диализ) и поэтому могут приводить к потерям нестабильных веществ. Гель-проникающая хроматография позволяет быстро решить эти задачи. Например, соли и небольшие молекулы легко могут быть удалены, поскольку они задерживаются всеми гелями.

Смена буфера достигается простым пропусканием раствора макромолекул через колонку, предварительно уравновешенную другим буфером. Поскольку макромолекулы движутся через гель с бóльшей легкостью, чем компоненты исходного буфера, они будут элюироваться буфером, которым была уравновешена колонка. Концентрирование макромолекул легко осуществляется простым добавлением к раствору сухих гранул геля, имеющего размер пор меньший, чем размер присутствующих макромолекул. При набухании гранул происходит поглощение воды, но не макромолекул, которые при этом концентрируются. Большинство процедур концентрирования макромолекул связано с одновременным увеличением концентрации присутствующих солей, что может вызвать изменения макромолекул (иногда диссоциацию или денатурацию). При использовании геля этой проблемы не существует, так как гель поглощает в равной степени и воду и соли.

Приведем ряд конкретных примеров использования гель-проникающей хроматографии в препаративных целях (т. е. для очистки и анализа):

1. В химических синтезах различных соединений обычно существует необходимость отделения продукта от реагентов. Например, при получении флуоресцентных антител (гл. 2 и 10) в результате реакции антитела с изотиоцианатом флуоресцеина

конъюгированный белок требуется отделить от непрореагировавшего красителя. Это можно сделать при помощи сефадекса, используя гель, в котором крупные молекулы белка выходят с холостым объемом. Естественно, что непрореагировавший белок не будет при этом отделяться от конъюгированного, однако для методов работы с флуоресцентными антителами это не обязательно.

2. При анализе ферментов или при определении требующихся кофакторов ферментные препараты иногда содержат ингибиторы с низкой молекулярной массой или собственно кофакторы. При изучении некоторых молекул физическими методами (например, флуоресцентной спектроскопией) в образце могут присутствовать вещества, искажающие результаты. Такие небольшие молекулы можно легко удалить на геле декстрана или полиакриламида.

3. Иногда подлежащие исследованию небольшие молекулы биополимера имеют в качестве примеси макромолекулы. В этих случаях оказываются полезными декстраны с малыми размерами пор. Так, белки часто требуется освободить от содержащихся примесей нуклеиновых кислот; это иногда осуществляется с использованием геля агарозы, который задерживает все белки, тогда как нуклеиновые кислоты выходят с холостым объемом.

4. Для большинства физических исследований нуклеиновых кислот образец не должен содержать белка. Этого легко достичь. Интересный образец из моей собственной лаборатории был получен из экстракта клеток: содержащуюся в нем ДНК изучали методом электронной микроскопии с использованием цитохромового метода Кляйншмидта (гл. 3). Маленькие порции (20—50 мкл) экстракта клеток, содержащего ДНК, пропускали через крошечные колонки с сефарозой, предварительно уравновешенные раствором, служащим для электронной микроскопии. ДНК выходила с колонок с холостым объемом в требуемом буфере, тогда как весь остальной материал задерживался. Последующее добавление цитохрома *с* давало образец, готовый к исследованию методом микроскопии.

5. Одним из наиболее распространенных приложений гельпроникающей хроматографии является очистка белков (см. «Приложение», стадия 7). Для очистки белка из экстракта клеток обычно бывает необходимо использовать последовательность операций, основанных на таких свойствах белка, как растворимость в некоторых растворах, величина заряда молекул, молекулярная масса и т. д. На стадии, где разделение проводится по размерам молекул, практически всегда используется гель-проникающая хроматография.

Гель-проникающая хроматография с успехом применяется и в аналитических целях. Определение молекулярной массы, как наиболее важная операция, уже упоминалось выше. Приведем несколько других примеров:

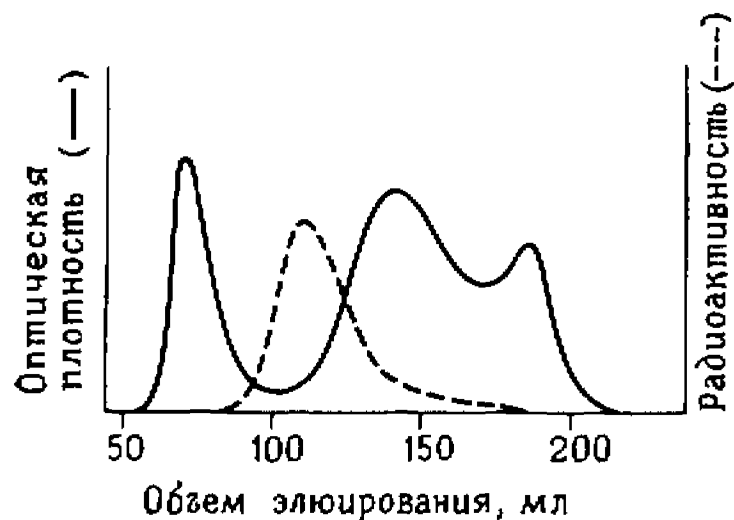


РИС. 8-20.

Разделение различных образцов нуклеиновых кислот с помощью хроматографии на сефарозе.

Клетки КВ были инфицированы полиовирусом, меченным ^{32}P. Вскоре после заражения клетки подвергали лизису, нуклеиновые кислоты выделяли и хроматографировали. Общее количество клеточных нуклеиновых кислот определяли путем измерения оптической плотности при 260 нм. Полио-РНК обнаруживали по ее радиоактивности. Пики слева направо соответствуют ДНК клеток КВ, полио-РНК, рибосомальной РНК КВ и транспортной РНК КВ. (Любезно предоставлено Pharmacia Fine Chemicals, Inc.)

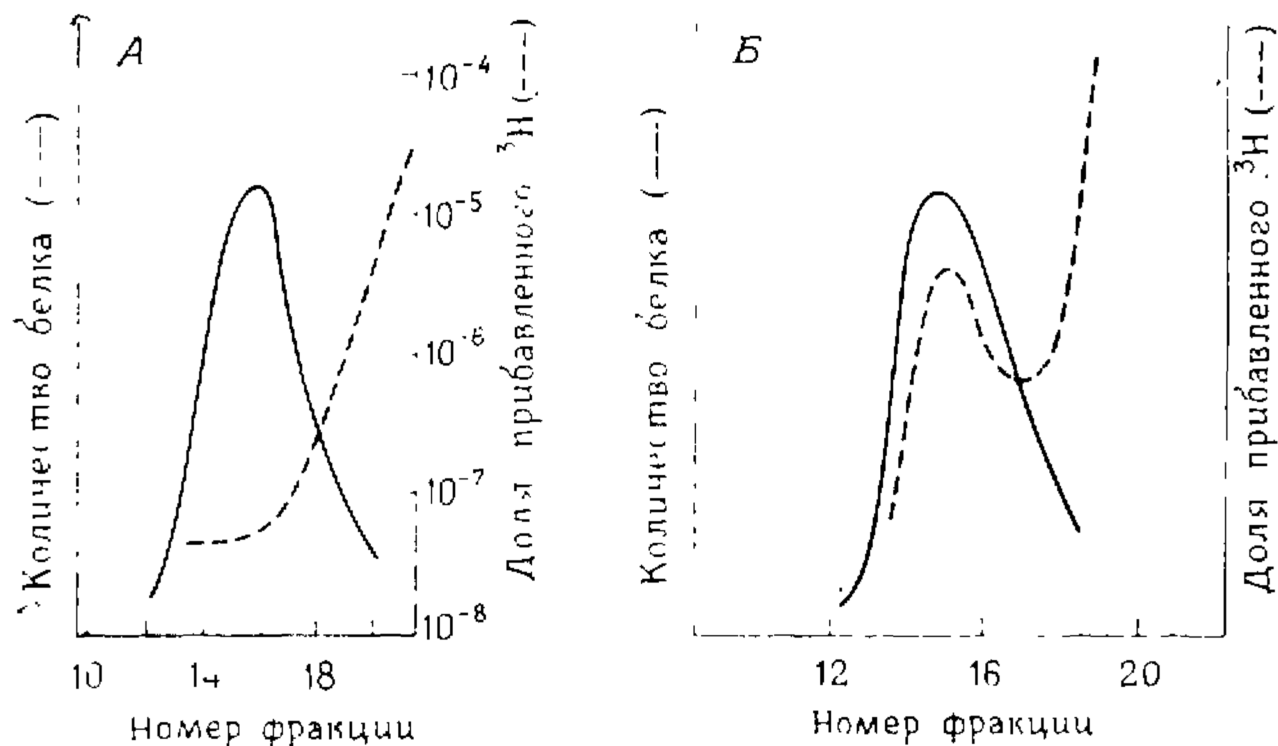


РИС. 8-21.

Один из самых ранних экспериментов ^3H-обмена.

Полипролин (*А*) и РНазу (*Б*) инкубировали несколько часов в ^3H_2O до достижения максимального обмена. Образцы затем разбавляли водой и через различные промежутки времени наносили на колонку с сефадексом G-25 для разделения белка и ^3H_2O. На графике *А* отсутствует ^3H, ассоциированный с полипролином, из чего можно заключить, что либо обмен не происходит, либо он происходит очень быстро. На графике *Б* показано, что в случае РНазы ^3H связывается с белком. [Воспроизведено с разрешения *Englander W.*, Biochemistry, 2, 798—807 (1965).]

1. При изучении метаболизма РНК различные фракции РНК обычно идентифицируют зонным центрифугированием или, что еще лучше, электрофорезом в полиакриламидном геле. Для этого же можно использовать и гель-проникающую хроматографию в геле агарозы. Пример такого разделения показан на рис. 8-20.

2. Для диагностики некоторых заболеваний человека требуется количественно определить различные фракции белка плазмы. Это можно осуществить прямо на геле декстрана. Такая процедура лежит в основе удобного теста на макро- и гиперглобулинемию.

3. Тритиевый обмен служит методом исследования структуры белка или ДНК (гл. 18). При этом требуется быстрое отделение макромолекул от ^3H_2O. Такого разделения можно достигнуть с использованием заряженного геля в течение 10 с, поскольку ^3H_2O сильно удерживается всеми гелями. Если поры имеют минимальный размер, макромолекулы выходят прямо с холостым объемом или вскоре после него. Пример этой операции показан на рис. 8-21.

4. Гель-проникающую хроматографию можно применять для изучения связывания между белками и небольшими молекулами либо путем разделения продукта и реагентов, либо с помощью пропускания белка через колонку, уравновешенную небольшими молекулами. Простой расчет позволяет определить константу связывания. Большая ценность метода гель-проникающей хроматографии в изучении химического равновесия обусловлена тем, что колонка может работать в широких пределах концентраций, pH, ионной силы и температуры элюирующего буфера, поскольку размер пор в геле не зависит от этих факторов.

Тонкослойная гель-проникающая хроматография

Как отмечалось выше, достоинствами тонкослойной хроматографии являются быстрое разделение, высокая чувствительность, простое оборудование, легкое элюирование и способность заменять хроматографию на бумаге в качестве аналитического метода. Тонкослойная гель-проникающая хроматография соединяет в себе преимущества обоих методов.

Тонкослойная гель-проникающая хроматография напоминает тонкослойную хроматографию тем, что здесь материал также наносится тонким слоем на стеклянную пластинку, образец вводится в виде точки, а подвижная фаза движется вдоль слоя. Однако есть и существенные различия:

1. В тонкослойной хроматографии сорбент высушивается перед нанесением образца. Гель же сушить нельзя, более того, он легко дегидратируется, поэтому в тонкослойной гель-проникающей хроматографии образец наносится на влажный гель, уравновешенный требуемым растворителем.

2. Тонкослойная хроматография осуществляется восходящим методом, тогда как в тонкослойной гель-проникающей хроматографии применяется нисходящий метод (рис. 8-7). Пластинку помещают в герметичную камеру, причем оба ее конца соединяют

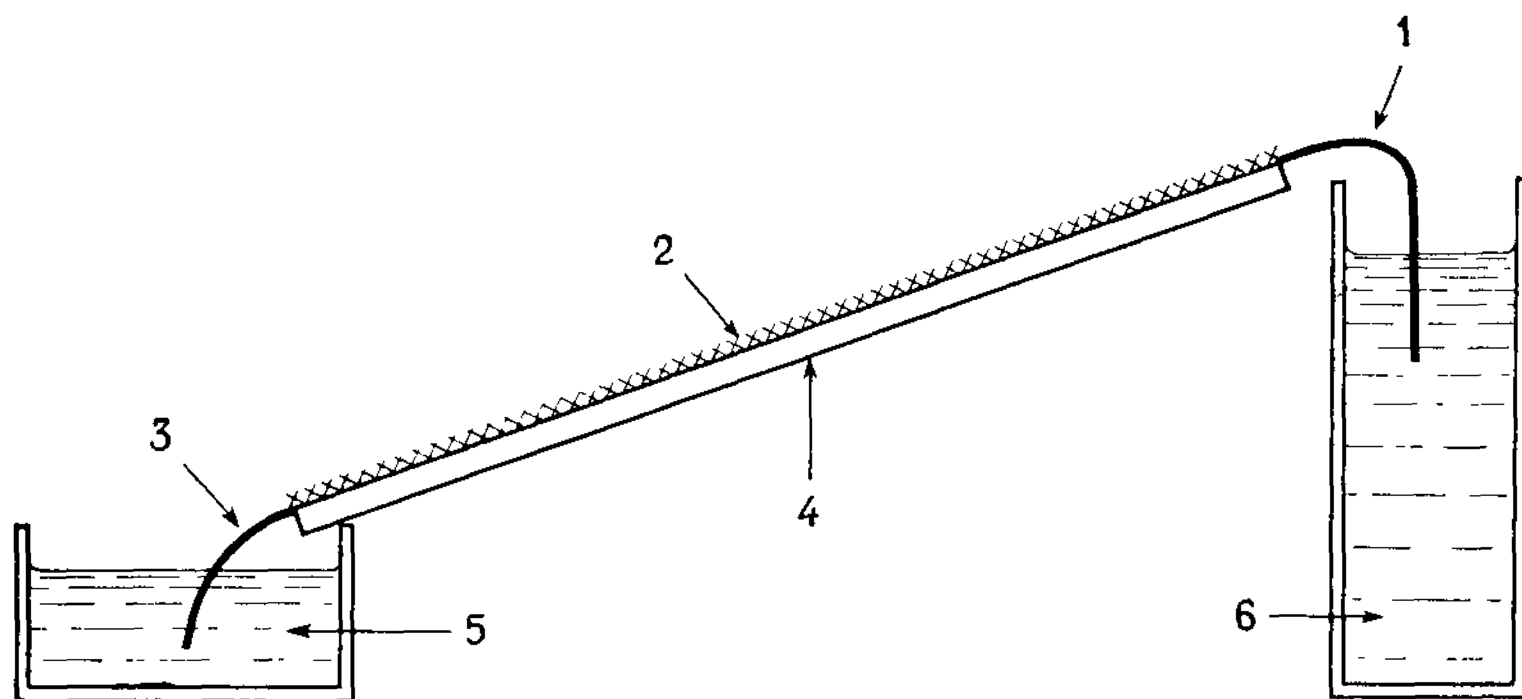


РИС. 8-22.

Схема проведения тонкослойной гель-проникающей хроматографии.

Гель и фильтровальную бумагу обычно закрывают каким-либо способом для предотвращения высыхания. 1 — полоска фильтровальной бумаги; 2 — тонкий слой геля; 3 — фильтровальная бумага; 4 — стеклянная пластинка; 5 — растворитель; 6 — растворитель для проявления.

с сосудами с помощью мостиков из фильтровальной бумаги (рис. 8-22). Жидкость движется через слой сорбента, причем скорость тока определяется углом наклона пластинки (обычно 20°). Как и в тонкослойной хроматографии, пробег заканчивается до того, как интересующее вещество перейдет в нижний сосуд. Однако здесь применяется проток жидкости, т. е. в отличие от тонкослойной хроматографии в этом случае отсутствует фронт растворителя. Поэтому в тонкослойной гель-проникающей хроматографии не измеряют значения R_f, а положения пятен определяют относительно выбранного стандарта.

Приложения тонкослойной гель-проникающей хроматографии

Если тонкослойная хроматография используется в первую очередь для аминокислот, сахаров, олигосахаров, липидов, стероидов и других небольших молекул, тонкослойная гель-хроматография применяется для белков, пептидов, нуклеиновых кислот, нуклеотидов и других гидрофильных веществ с высокой молекулярной массой.

Наибольшую ценность тонкослойная гель-проникающая хроматография представляет для определения молекулярной массы белков и пептидов. Для этого строят график, аналогичный показанному на рис. 8-19, где по оси y откладывают *относительную подвижность*. Метод позволяет получить весьма точные значения, особенно в тех случаях, когда проводится несколько определений.

Тонкослойная гель-проникающая хроматография находит применение в клинической диагностике для определения патологических белков в сыворотке крови, спинномозговой жидкости и моче. Конечно, метод используется и для проверки чистоты белков, ферментов и т. д. На основе этого метода разработаны такие модификации, как иммунодиффузия, иммуноэлектрофорез и изоэлектрическая фокусировка.

По использованию тонкослойной гель-проникающей хроматографии имеется сравнительно мало литературы, однако этот метод находит все более широкое применение.

Ионообменная хроматография

Ионообменник представляет собой твердый носитель, химически соединенный с заряженными группами, способными связывать ионы за счет электростатического взаимодействия. Он способен обменивать эти ионы на ионы, содержащиеся в водном растворе. Ионообменники используются в колоночной хроматографии для разделения молекул в соответствии с их зарядом.

Принцип ионообменной хроматографии состоит в том, что заряженные молекулы обратимо *адсорбируются* ионообменником, так что молекулы могут связываться и элюироваться в зависимости от ионного состава среды. Разделение на ионообменниках обычно проводится в две стадии: сперва соединение, которое требуется отделять, связывается с ионообменником в условиях образования стабильной связи, затем колонку промывают буфером с другим значением pH или с другой ионной силой, в результате чего компоненты буфера конкурируют со связанным веществом за связывающий центр.

Свойства ионообменников

Ионообменники обычно представляют собой трехмерную структуру (матрицу), содержащую ковалентно связанные с ней заряженные группы. Если группы заряжены отрицательно, они будут обменивать положительные ионы; в этом случае они служат *катионообменниками*, или *катионитами*. Типичными группами в катионитах являются сульфогруппы SO_3^-. Если с такой группой связан ион H^+, говорят, что катионит находится в кислой форме. Он может, например, обменять один H^+ на один Na^+ или два H^+ на один Ca^{+2}. Ионообменные смолы, содержащие сульфогруппы, называют *сильными катионообменниками*. Другими широко распространенными сорбентами этого типа являются смолы, содержащие фенольную гидроксильную или карбоксильную группы,

представляющие собой *слабые* катионообменники. Если заряд группы положителен, например четвертичная аминогруппа, она является сильноосновным *анионообменником*. В качестве слабоосновных анионообменников используют ароматические или алифатические аминогруппы.

Матрицу можно изготовить из различных материалов. Чаще всего применяются декстран, целлюлоза и сополимер стирола и дивинилбензола, причем дивинилбензол сшивает цепи полистирола. В табл. 8-3 даны составы многих распространенных ионообменников.

ТАБЛИЦА 8-3

Свойства различных ионообменников

Матрица	Тип обменника[a]	Функциональные группы	Фирменное название
Декстран	СК	Сульфопропильные	SP-Sephadex (СП-сефадекс)
	СлК	Карбоксиметильные	CM-Sephadex (КМ-сефадекс)
	СА	Диэтил-(2-оксипропил)-аминоэтильные	QAE-Sephadex (КАЭ-сефадекс)
	СлА	Диэтиламиноэтильные	DEAE-sephadex (ДЭАЭ-сефадекс)
Целлюлоза	К	Карбоксиметильные	CM-cellulosa (КМ-целлюлоза)
	К	Фосфатные	P-cel (фосфоцеллюлоза)
	А	Диэтиламиноэтильные	DEAE-cellulosa (ДЭАЭ-целлюлоза)
	А	Полиэтилениминные	PEI-cellulosa (ПЭИ-целлюлоза)
	А	Бензоилированные нафтоилированные, диэтиламиноэтильные	DEAE (BND)-cellulosa [ДЭАЭ(БНД)-целлюлоза]
	А	*п*-Аминобензоильные	PAB-cellulosa (ПАБ-целлюлоза)
Сополимер стирола и дивинилбензола	СК	Сульфокислота	AG-50
Акрильная	СлК	Карбоксильные	BiO-Rex 70 (биорекс 70)
Фенольная	СК	Сульфокислота	Bio-Rex 40 (биорекс 40)
Эпоксиаминная	СлА	Третичная аминогруппа	AG-3

[a] К — катионообменник; А — анионообменник; С — сильный; Сл — слабый.

Общая емкость ионообменника определяется его способностью связывать обмениваемые ионы и выражается в миллиэквивалентах обменивающих групп на 1 мг сухого веса сорбента. Эта

величина указывается изготовителем и имеет существенное значение, так как при перегрузке колонки ионы анализируемого образца будут проходить через колонку без связывания.

Реальная емкость зависит от условий проведения конкретного эксперимента (т. е. pH, ионная сила). Например, степень заряженности ионообменника зависит от pH (влияние pH невелико в случае сильных ионообменников). Другим фактором является ионная сила, поскольку маленькие ионы, находящиеся вблизи заряженных групп, конкурируют с молекулами исследуемого вещества в связывании. Эта конкуренция достаточно эффективна, если исследуемое вещество представляет собой макромолекулу, так как более высокий коэффициент диффузии маленьких ионов обеспечивает большее число столкновений с заряженными группами ионообменника. Отсюда ясно, что увеличение концентрации буфера приводит к увеличению конкуренции.

Важным параметром является и *пористость* матрицы, поскольку заряженные группы находятся как снаружи, так и внутри матрицы. Большие молекулы не всегда способны проникать в поры; таким образом реальная емкость сорбента будет уменьшаться с увеличением размеров исследуемых молекул. Пористость смол на основе полистирола определяется числом поперечных сшивок дивинилбензолом (пористость уменьшается с увеличением количества дивинилбензола). В смолах типа дауэкс процентное содержание дивинилбензола указывается числом после знака X, например, дауэкс-50-X8 содержит 8% дивинилбензола.

Ионообменники производятся в виде частиц различного размера, называемого *ситовым размером* (меш). Более мелкие частицы имеют повышенное отношение площади поверхности к объему и, следовательно, бóльшую емкость и меньшее время обмена в данном объеме смолы. С другой стороны, при этом уменьшается скорость тока, что может вызывать диффузионное уширение зон.

Большой набор ионообменников, имеющих широкий спектр свойств (заряд, емкость, пористость, размер частиц), делает затруднительным выбор оптимального варианта для конкретной задачи. Как определить тип материала для колонки и условия связывания и элюирования, будет обсуждаться в следующем разделе.

Выбор ионообменника

В первую очередь следует решить, какой ионообменник нужен для решения данной задачи — анионит или катионит. Если вещества, которые должны связываться на колонке, имеют один заряд (либо плюс, либо минус), выбор не представляет труда. Однако многие вещества (например, белки) несут как отрицательный, так и положительный заряд одновременно, и их общий заряд зависит

от pH. В таких случаях решающим фактором служит стабильность вещества при различных значениях pH. Большинство белков стабильно в таких пределах значений pH (т. е. при которых они не денатурируют), когда они заряжены либо положительно, либо отрицательно. Следовательно, если белок стабилен при значении pH выше изоэлектрической точки, требуется анионит, если же он стабилен при pH ниже изоэлектрической точки, следует использовать катионит. Выбор между сильным и слабым ионообменником также основан на влиянии pH на заряд и стабильность. Например, если вещество слабо ионизовано и требует для ионизации очень низких или очень высоких значений pH, для хроматографирования необходимо выбрать сильный ионообменник, поскольку он работает при экстремальных значениях pH. Однако, если вещество лабильно, следует предпочесть слабый ионообменник. Слабые ионообменники очень эффективны для отделения молекул с высоким зарядом от молекул с низким зарядом, поскольку слабо заряженные ионы обычно не связываются в таких условиях. Слабые ионообменники обычно обеспечивают лучшее разделение веществ с малыми различиями в зарядах.

Ионообменники типа сефадекса и биогеля очень хороши для макромолекул, нестабильных при низкой ионной силе. Так как поперечные связи в этих материалах увеличивают нерастворимость матрицы даже при ее высокой полярности, можно добиться в несколько раз большей плотности ионизующихся групп, чем это достижимо в ионообменниках на основе целлюлозы. Увеличение плотности заряда означает увеличение сродства, т. е. связывание может осуществляться при более высокой ионной силе. С другой стороны, эти ионообменники обладают некоторыми свойствами молекулярных сит, поэтому иногда различия в молекулярных массах могут аннулировать распределение, вызванное различием в зарядах.

Выбор пористости и ситового размера

Небольшие молекулы лучше разделяются на матрицах с малым размером пор (с высокой степенью сшивания), поскольку для них реальная емкость сорбента достаточно велика, тогда как для разделения макромолекул необходимы сорбенты с большими размерами пор. Однако большинство ионообменников, за исключением сефадекса, не обладают заметной зависимостью между пористостью и молекулярной массой разделяемых веществ *.

Ионообменники на основе целлюлозы являются наилучшими для очистки больших молекул, таких, как белки и полинуклеоти-

* Следует отметить, что все сорбенты на основе стирола и дивинилбензола отвечают вышеизложенному.

ды, поскольку из-за волокнистой структуры матрицы все функциональные группы находятся на поверхности и доступны даже для самых крупных молекул.

Выбор ситового (меш) размера, как правило, представляет трудность. Малый размер частиц обычно улучшает разделение, но приводит одновременно к замедлению скорости тока, а это в свою очередь вызывает увеличение размывания зон и ухудшение разрешения. Поэтому оптимальный ситовый размер чаще всего приходится подбирать эмпирическим путем.

Выбор pH, буферов и ионных условий

Так как буферы сами по себе состоят из ионов, они также принимают участие в ионном обмене, в результате чего равновесие pH может изменяться. Для решения этой проблемы принято *правило: катионные буферы используются с анионитами, а анионные буферы — с катионитами.* Поскольку связывание зависит от ионной силы, выбранный буфер должен иметь большую буферную емкость, но при этом ионная сила не должна быть слишком высокой. Более того, для улучшения разрешения принято использовать для элюирования ионные условия, близкие к тем, которые были в образце при нанесении его на колонку (так называемые *стартовые условия*).

Методика ионообменной хроматографии

Принципиальной основой ионообменной хроматографии является то, что сродство вещества к ионообменнику зависит от электрических свойств его самого и относительного сродства других заряженных веществ, находящихся в растворителе. Следовательно, связанное вещество можно элюировать с помощью изменения pH до значения, изменяющего заряд вещества, или добавлением конкурирующего вещества, одним из примеров которого могут служить соли. Поскольку различные вещества обладают разными электрическими свойствами, условия элюирования будут меняться для каждого вида связанных молекул. В общем, для получения хорошего разделения следует выбрать либо непрерывное элюирование в градиенте ионной силы, либо ступенчатое элюирование. (Градиент только pH не используют по причине трудности создания его без одновременного увеличения ионной силы.) При хроматографии на анионитах постоянно повышают либо pH и ионную силу, либо только ионную силу элюента. Хроматографию же на катионитах проводят как в градиенте pH, так и в градиенте ионной силы элюирующего буфера. На практике выбор условий элюирования проводится методом проб и ошибок с учетом условий стабильности анализируемого вещества. Напри-

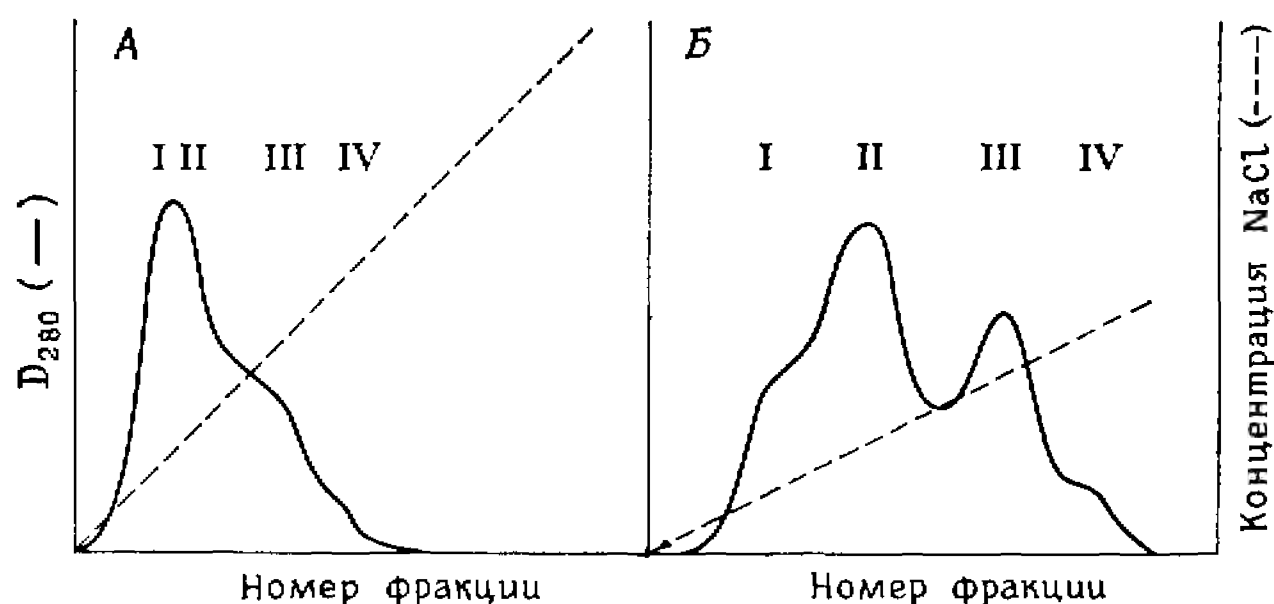


РИС. 8-23.

Разделение четырех белков при помощи ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе.

Обратите внимание на сильную зависимость от вида градиента NaCl. На графике *А* более крутой градиент позволяет достигнуть только частичного разделения на две фракции. При более пологом градиенте на графике *Б* белки II и III явно разделяются, а присутствие белков I и IV становится очевидным.

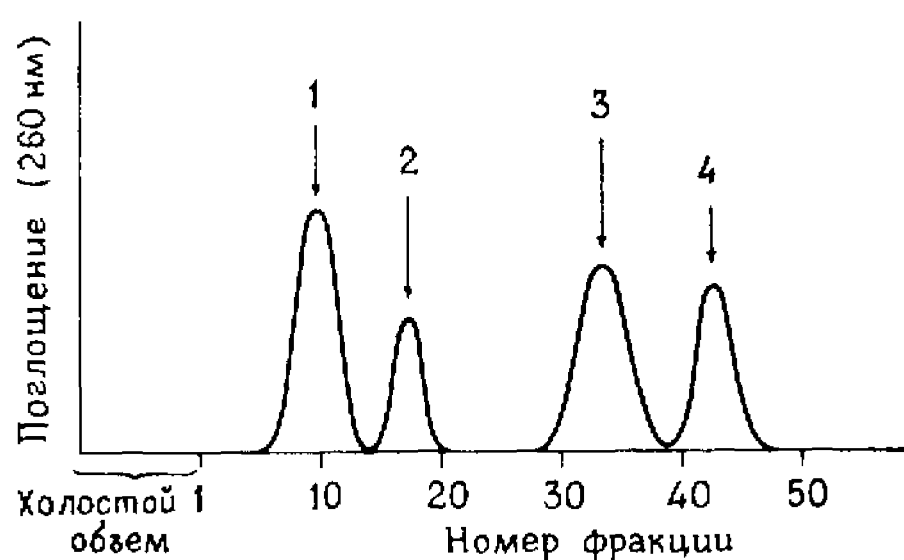


РИС. 8-24.

Разделение нуклеозидов РНК путем хроматографии на дауэксе-50W-4X.

Образец, представляющий собой гидролизат РНК, обработанной щелочной фосфатазой для удаления концевых фосфатных групп, наносили на колонку и элюировали 0,4 М формиатом аммония при pH 4. Для определения количества каждого вещества измеряли поглощение, поскольку соотношение между значением поглощения при 260 нм и концентрацией известно. *1* — уридин; *2* — гуанозин; *3* — аденозин; *4* — цитозин.

мер, при хроматографии нестабильных соединений желательно соблюдать постоянное значение pH. Типичная ионообменная хроматограмма при градиентном элюировании показана на рис. 8-23.

Для разделения очень схожих веществ элюирование можно проводить без изменений pH или ионной силы. Например, предположим, что ионные условия выбраны таким образом, что связывание молекулы со многими центрами связывания настолько

слабо, что существует определенная вероятность диссоциации всех связей в течение заданного времени. Таким образом, молекула находится с ионообменником в равновесии и будет перемещаться по колонке с определенной скоростью. Скорость движения будет соответствовать вероятности диссоциации, поэтому молекулы с мало отличающимся сродством к ионообменнику будут двигаться по колонке с различной скоростью, т. е. произойдет их разделение. (Формально в данном случае это эквивалентно адсорбционной хроматографии.) Простой вариант этого метода носит название *метода стартовых условий* и заключается в том, что образец адсорбируется и элюируется в одном и том же растворителе. В общем, разрешение улучшается, если скорость тока очень мала, однако с уменьшением скорости тока появляется проблема диффузионного размывания, в результате которого разрешение может ухудшаться. Оптимальная скорость тока обычно определяется эмпирически. На рис. 8-24 изображена типичная хроматограмма, полученная методом стартовых условий.

При выборе условий элюирования важно представлять себе, каким образом элюируемая жидкость будет влиять на анализ веществ. Например, при использовании спектрального анализа буфер не должен обладать поглощением в выбранном диапазоне длин волн. Если же образец анализируется по его радиоактивности с использованием счетчика Гейгера, то полезно использовать нелетучие буферы для предотвращения включения радиоактивности в кристаллы, образующиеся в результате высыхания буфера. В случае применения сцинтилляционного счетчика важно, чтобы элюируемая жидкость не содержала примесей, вызывающих тушение.

Приложения ионообменной хроматографии

В принципе на ионообменниках можно хроматографировать любое заряженное вещество. Ионообменные смолы более пригодны для разделения небольших органических молекул и используются даже для разделения ионов металлов (например, для отделения Ca^{2+} от Mg^{2+}). Белки и полисахариды лучше разделяются на ионообменниках на основе целлюлозы, декстрана и полиакриламида. Декстрановые и полиакриламидные ионообменники широко применяются для разделения нуклеотидов, аминокислот и других биологически важных небольших молекул.

Специальные методики в хроматографии нуклеиновых кислот и белков, связывающихся с нуклеиновыми кислотами

Столь сложные молекулы, как белки и нуклеиновые кислоты, обладают таким разнообразием функциональных групп, центров связывания и стабилизирующих сил, что их поведение на стандартных хроматографических материалах трудно даже предсказать. Для них разработаны хроматографические методы, основанные на специфическом взаимодействии молекул.

Хроматография на ДНК-целлюлозе

ДНК-целлюлоза связывает многие белки, которые связываются с ДНК, и может поэтому использоваться для отделения таких белков от несвязывающихся с ДНК белков или от других веществ. Для получения ДНК-целлюлозы порошок целлюлозы смешивают с раствором одно- или двухцепочечной ДНК и смесь высушивают в вакууме. Затем порошок промывают для удаления несвязанной ДНК и вновь сушат перед хранением. Механизм связывания ДНК с целлюлозой неизвестен. При продолжительном использовании колонки из этого материала приобретают склонность к потере ДНК; для предотвращения этого сухой порошок ДНК-целлюлозы периодически суспендируют в этаноле и

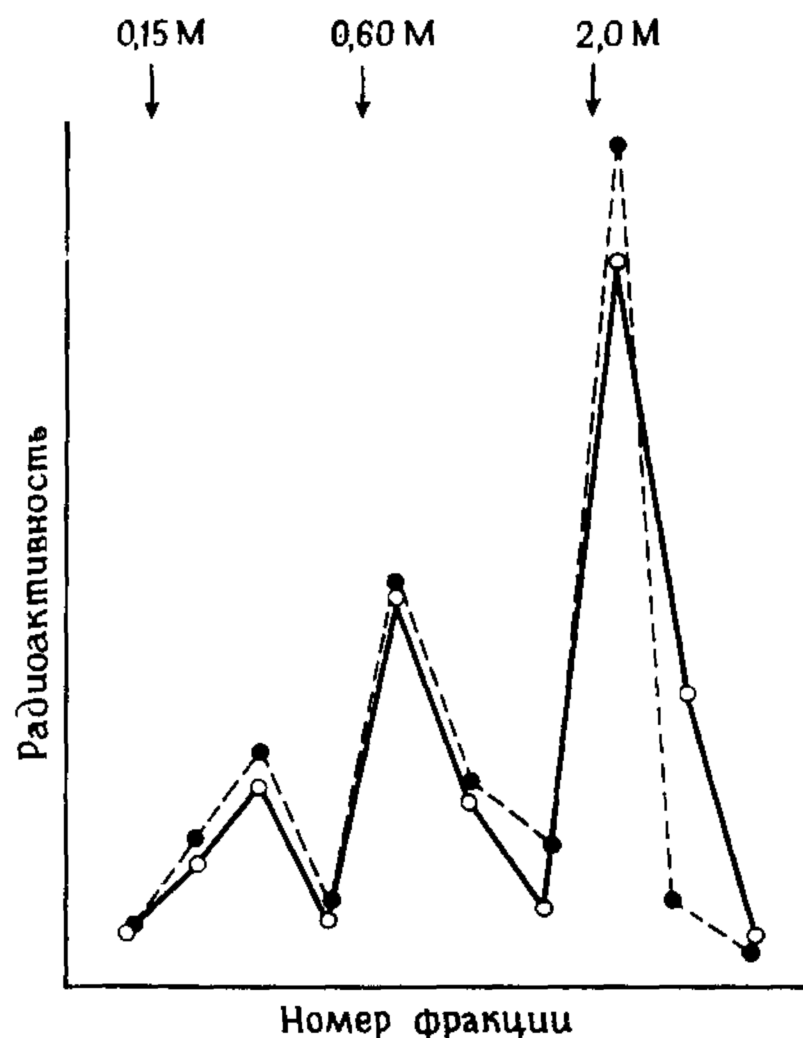


РИС. 8-25.

Пример хроматографии на ДНК-целлюлозе.

Клетки *E. coli* инфицировали фагом T4 в среде, содержащей ^{14}C-лейцин; другую культуру инфицировали фагом T4, мутантным в гене 32, в среде, содержащей ^{3}H-лейцин. Белки выделяли, смешивали и наносили на колонку с одноцепочечной ДНК-целлюлозой. Колонку последовательно промывали 0,15, 0,60 и 2,0 *М* NaCl. Во фракции, соответствующей концентрации 2,0 *М*, имелся дефицит по ^{3}H-лейцину, показывающий, что эта фракция содержит меченный ^{14}C белок гена 32. Это было первым успешным применением хроматографии на ДНК-целлюлозе для очистки ДНК-связанных белков. ○ ^{14}C; ● ^{3}H. [*Alberts B. M.*, Fed. Proc., 29, 1154—1175 (1970).]

подвергают интенсивному облучению ультрафиолетовыми лучами. При этом ДНК ковалентно связывается с целлюлозой.

Хроматография на ДНК-целлюлозе в первую очередь используется для очистки белков, связывающихся с ДНК. Смесь белков в буфере с низкой ионной силой (условия связывания белков с ДНК) пропускают через колонку. Затем колонку промывают для удаления несвязанных белков и элюируют в градиенте возрастания ионной силы. Белки при этом элюируются в порядке увеличения прочности связывания.

Метод впервые был применен Брюсом Альбертсом для обнаружения белков, связывающихся с ДНК, в *E. coli*, инфицированной фагом Т4 (рис. 8-25).

В настоящее время этот прием стал стандартной процедурой при очистке полимеров, нуклеаз, репрессоров и т. д. Поскольку используется как одно-, так и двухцепочечная ДНК, существует возможность разделения белков и по степени связывания с каждой из них.

Колонки с метилированным альбумином на кизельгуре (МАК)

Метилированный сывороточный альбумин адсорбируется на кизельгуре (инфузорная земля), прочно связываясь с ним. Джозеф Манделл и Альфред Херши показали, что колонки с таким материалом связывают одно- и двухцепочечную ДНК, причем

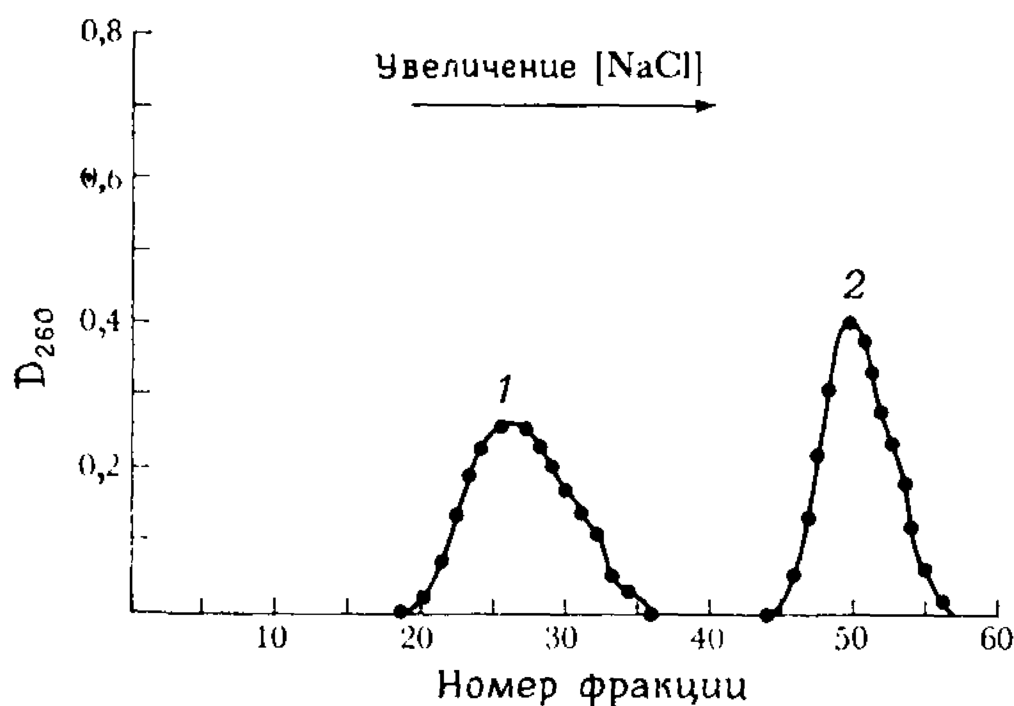


РИС. 8-26.

Разделение равных количеств целых и половинных молекул ДНК Т2 с помощью хроматографии на МАК.

Половинные молекулы были получены методом гидродинамического фрагментирования (гл. 18). Элюирование проводили в градиенте возрастания концентрации NaCl. Отметим, что бо́льшие молекулы связываются прочнее и для их элюирования необходима более высокая концентрация NaCl. Поскольку все «половины» имеют неодинаковые размеры, зона половинных молекул шире, чем зона целых. *1* — половинные молекулы; *2* — целые молекулы.

оказывается возможным их функционирование при элюировании в градиенте возрастания ионной силы. При использовании различных условий метод эффективен для разделения нативных ДНК по молекулярной массе, составу оснований и степени гликозилирования; для разделения одно- и двухцепочечных ДНК; для отделения двухцепочечных ДНК с одноцепочечными концами от ДНК без таких концов; для отделения транспортной РНК от рибосомной РНК; для разделения различных транспортных РНК одна от другой. Пример использования таких колонок приведен на рис. 8-26.

Колонки с гистонами на кизельгуре

Гистоны также обладают способностью адсорбироваться на кизельгуре. Поскольку гистоны образуют комплексы только с двухцепочечной ДНК или с РНК, двухцепочечная ДНК может быть очищена этим методом. Если элюирование проводится путем повышения ионной силы, возможно разделение ДНК в соответствии с составом оснований, причем ДНК с высоким содержанием гуанина и цитозина элюируется в первую очередь.

Хроматография на гидроксиапатите

Гидроксиапатит представляет собой кристаллическую форму $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, полученную из кристаллов $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$. Колонки с гидроксиапатитом обладают свойством связывать вещества, взаимодействующие с кальцием, включая ДНК, РНК, нуклеогистон, поли- и олигонуклеотиды и фосфопротеины. Связывание обеспечивается за счет фосфатных групп в связываемом

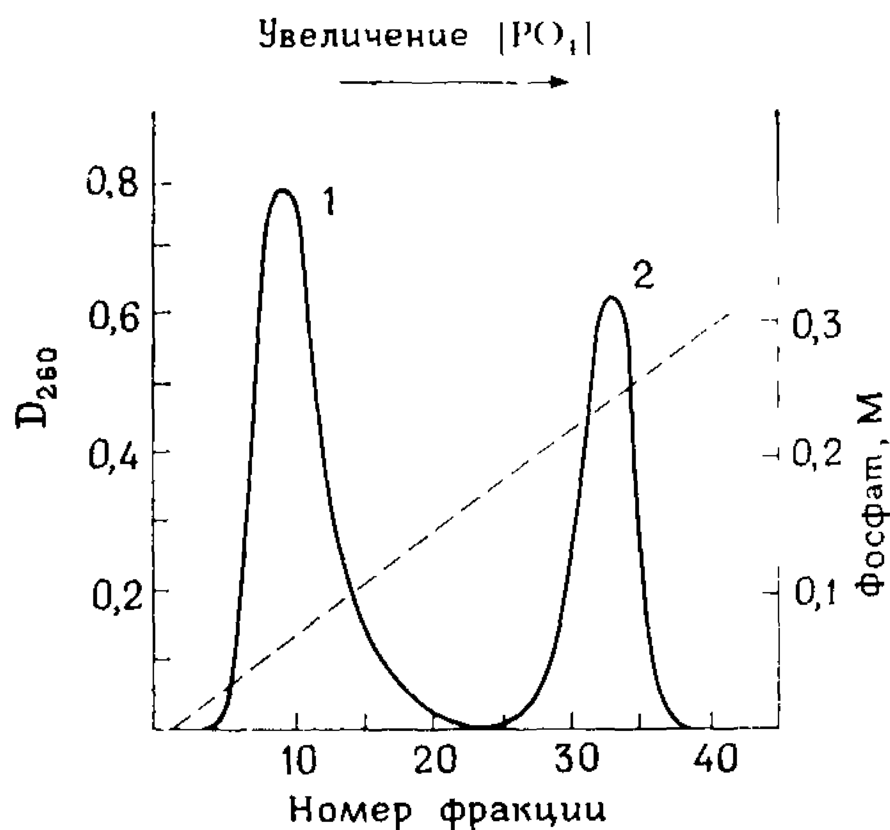


РИС. 8-27.

Разделение одно- и двухцепочечных ДНК при помощи хроматографии на гидроксиапатите.

Элюирование проводилось в градиенте возрастающей концентрации фосфата (— — — —). *1* — одноцепочечная ДНК; *2* — двухцепочечная ДНК.

веществе и происходит при низкой концентрации фосфатного буфера, элюирование же осуществляется просто путем повышения его концентрации. Этот метод имеет серьезное преимущество в случае хроматографии нуклеиновых кислот, заключающееся в малой зависимости поведения вещества на колонке от молекулярной массы. На гидроксиапатите успешно фракционируются следующие смеси: двух- и одноцепочечные ДНК, глюкозилированная и неглюкозилированная ДНК, различные нуклеогистоны, рибосомная и вирусная РНК, одноцепочечная и двухцепочечная РНК. Пример использования гидроксиапатита приведен на рис. 8-27.

Аффинная хроматография

Аффинная хроматография использует специфическое сродство между выделяемым веществом и специфически связывающейся с ним молекулой (*лигандом*). Материал для колонки синтезируется путем ковалентной пришивки молекулы (которая может быть как макромолекулой, так и небольшой молекулой) к нерастворимой матрице. После этого материал в колонке способен адсорбировать из раствора вещество, которое требуется выделить. Элюирование вещества осуществляется в условиях, когда связывание невозможно.

Для успешного проведения аффинной хроматографии следует иметь в виду следующее: 1) матрица должна представлять собой вещество, которое не адсорбирует молекулы в сколько-нибудь заметной степени; 2) лиганд должен присоединяться к матрице без каких-либо изменений связывающих свойств; 3) лиганд должен обеспечивать относительно прочное связывание, поскольку слабое связывание обеспечивает удерживание, но может не привести к полному разделению; 4) условия элюирования не должны приводить к разрушению выделяемого соединения. В качестве матрицы чаще всего используют агарозу (сефароза, Pharmacia Fine Chemicals, Inc.), поскольку при этом обеспечивается минимальная адсорбция, сохраняются хорошие условия для поддержания скорости тока после связывания с лигандом и существует стабильность при предельных значениях pH и ионной силы вплоть до 7,0 М гуанидинийхлорида и мочевины, которые часто бывают необходимы для успешного элюирования. Агароза пригодна для связывания либо с реагентами для аффинной хроматографии белков, мембран и стероидов или с конканавалином А, который является адсорбентом для полисахаридов и гликопротеинов, содержащих α-D-маннозильные и α-D-глюкозильные остатки (например, клеточные мембраны и целые клетки).

Основной областью применения аффинной хроматографии служит очистка белков, мембран и полисахаридов *. Некоторые примеры этого приведены ниже.

Очистка ферментов. Субстрат, представляющий собой прочно связывающий ингибитор или кофактор, можно связать с матрицей. Если смесь белков или даже неочищенный экстракт клеток пропустить через такую колонку, то на колонке останется только то вещество, которое способно связываться. В некоторых случаях ферменты могут быть получены в достаточно чистом виде прямо из очень сложных смесей. Однако зачастую с одним и тем же субстратом или кофактором могут связываться несколько ферментов, поэтому обычно таким методом можно достичь только неполной очистки.

Очистка антител. Осуществляется с помощью сефарозы, активированной бромцианом, к которой присоединяются различные антигены, такие, как белки, вирусы или альбумин бычьей сыворотки, связанные с гаптенами; метод является наилучшим для получения чистых антител.

Очистка транспортных белков. Проводится обычно на сефарозе, связанной с веществом, которое должно транспортироваться (например, тироксин-связывающие глобулины, эстрадиол-связывающие белки, а также гормональные и лекарственные рецепторы).

Очистка мембран и частиц, содержащих известные вещества. Мембраны, с которыми связываются гормоны, можно очистить с использованием сефарозы, на которой иммобилизован гормон; вирус гриппа, содержащий нейраминидазу на поверхности, также можно получить в чистом виде, применив сефарозу со связанным ингибитором нейраминидазы.

Очистка гликопротеинов. Эффективно применение конканавалин А-сефарозы.

Выделение специфических клеток животных. Осуществляется с помощью иммобилизованных агглютининов, таких, как конканавалин А, агглютинина зародыша пшеницы или фитогемагглютинина. Например, клетки некоторых опухолей, вызываемых вирусом, можно отделить от нормальных клеток, поскольку клетки опухоли прочнее связываются с конканавалин А-сефарозой.

---

* Одной из причин, по которой метод не нашел широкого применения для выделения НК, является трудная доступность лигандов — олигонуклеотидов с определенной последовательностью мономеров. Успехи в области синтеза олигонуклеотидов должны резко изменить ситуацию в ближайшее время.— *Прим. ред.*

Приложение

Очистка фермента: пример использования многих хроматографических методик

Следует сказать, что процедуру очистки фермента трудно уместить в нескольких параграфах, тем не менее полезно рассмотреть типичную схему очистки, чтобы понять, каким образом применяются различные хроматографические методы. В качестве примера рассмотрим очистку ДНК-полимеразы I из *E. coli*. Метод предложен Паулем Энглундом, который модифицировал первоначальную методику, разработанную в лаборатории Артура Корнберга.

Стадия 1. Разрушение клетки бактерии. Первой стадией почти всегда является разрушение клетки бактерий. Это достигается ультразвуковой обработкой (гл. 18) или последовательным замораживанием — оттаиванием для размягчения клеточной стенки с последующим перемешиванием в миксере с мелкими стеклянными шариками. После разрушения большинства клеток стеклянные шарики, неразрушившиеся клетки и клеточные стенки удаляют центрифугированием.

Стадия 2. Частичное удаление нуклеиновых кислот. Нуклеиновые кислоты осаждают добавлением сульфата стрептомицина. Вязкость раствора при этом существенно понижается, что позволяет провести концентрирование и удаление нуклеиновых кислот. Эта операция необходима, поскольку нуклеиновые кислоты могут сорбироваться на хроматографических колонках, которые будут использоваться в дальнейшем для разделения белковых компонентов клеток.

Стадия 3. Окончательное удаление нуклеиновых кислот и предварительное удаление некоторых белков автолизом. Для активации нуклеаз к смеси добавляют хлористый магний. После продолжительной инкубации почти все нуклеиновые кислоты распадаются до нуклеотидов и небольших олигонуклеотидов, которые остаются в растворе при осаждении белков на стадии 4.

Стадия 4. Фракционирование сульфатом аммония. Белки имеют различную растворимость в концентрированных растворах солей, поэтому их можно разделять фракционным осаждением при высокой ионной силе. Можно использовать различные соли, однако предпочтение отдается сульфату аммония, поскольку при этом не происходит существенных изменений pH, он недорог, прекрасно растворим и не дестабилизирует белков (гл. 18). Напротив, многие белки становятся стабильными в присутствии иона NH_4^+. Таким образом, экстракт обрабатывают $(NH_4)_2SO_4$ такой концентрации, при которой осаждаются все белки, кроме полимеразы. Осадок удаляют центрифугированием, а к суперна-

танту добавляют избыток $(NH_4)_2SO_4$ до достижения концентрации, при которой осаждается полимераза. Этот осадок отделяют и вновь растворяют в буфере, подходящем для проведения стадии 5.

Стадия 5. Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. Вещество после стадии 4 наносят на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой при значениях pH и ионной силы, обеспечивающих адсорбцию на колонке всех нуклеиновых кислот без связывания полимеразы. Эта стадия необходима потому, что небольшие количества нуклеиновых кислот, остающиеся после стадии 4, будут мешать адсорбции на фосфоцеллюлозе на следующей стадии. Свободный объем колонки собирают для использования на стадии 6.

Стадия 6. Хроматография на фосфоцеллюлозе. Хроматография на колонке с фосфоцеллюлозой позволяет отделить большинство других белков от полимеразы. Немногие остающиеся белки удаляются на следующей стадии.

Стадия 7. Гель-проникающая хроматография на сефадексе. Фракции с колонки с фосфоцеллюлозой, содержащие полимеразу, хроматографируют на сефадексе, где разделение происходит по молекулярной массе. Эффективность данной стадии обусловлена более высокой молекулярной массой полимеразы по сравнению с оставшимися белками. Все белки из элюата на стадии 6 отделяются на сефадексе. Фракции, содержащие полимеразу, таким образом, являются чистыми. Затем их обрабатывают $(NH_4)_2SO_4$ для осаждения полимеразы с тем, чтобы сконцентрировать очищенный фермент. Осадок после этого растворяют в малом объеме подходящего буфера.

Список литературы

Bobbit J. M., Schwarting A. E., Gutter R. J., Introduction to Chromatography, Reinhold, 1968.

Chovin P., Gas Chromatography, in "Comprehensive Biochemistry", vol. 4, edited by M. Florkin and E. H. Stotz, Elsevier, 1962.

Fisher L., An Introduction to Gel Chromatography, in "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", edited by T. S. Work and E. Work, American Elsevier, 1969.

Helferich F., Ion Exchange, McGraw-Hill, 1962.

Ingram V. M., Abnormal Human Haemoglobins. 1. The Comparison of Normal Human and Sickle-Cell Haemoglobins by "Fingerprinting", Biochim. Biophys. Acta, **28**, 539—545 (1959). Развитие метода «отпечатков пальцев».

Mandell J. D., Hershey A. D., A Fractionating Column for Analysis of Nucleic Acids, Analyt. Biochem., **1**, 66—77 (1960). Первое описание хроматографии на МАК.

Martin A. J. P., Synge R. L. M., A New Form of Chromatography Employing Two Liquid Phases, Biochem. J., **35**, 1358—1368 (1941). В этой статье впервые описана распределительная хроматография.

Peterson E. A., Cellulosic Ion Exchangers, in "Laboratory Techniques in

Biochemistry and Molecular Biology", vol. 2, edited by T. S. Work and E. Work, North-Holland, 1970, pp. 228—400.

Purnell H., Gas Chromatography, Wiley, 1962.

Randerath K., Thin-Layer Chromatography, Academic Press, 1966.

Хорошим источником информации могут служить брошюры, выпускаемые фирмами Pharmacia Fine Chemicals, Inc. and Bio-Rad Laboratories. Самую новую информацию можно найти в журналах Chromatorgaphy Journal of Chromatography and Journal of Gas Chromatography.

Задачи

8-1. Предположим, что фермент диссоциирует на четыре идентичные субъединицы и вы хотите проверить ферментативную активность индивидуальных субъединиц, но при этом следует быть уверенным в том, что в образце не остается тетрамера. Какую хроматографическую систему вы выберете, чтобы отделить мономеры от тетрамера?

8-2. При попытке очистить белок было обнаружено, что белок прочно связывается с ДНК. При прибавлении ДНКазы для разрушения ДНК оказалось, что ДНКаза связывается в комплекс без разрушения ДНК. Поэтому для удаления ДНК ДНКазу использовать нельзя. Для диссоциации комплекса ДНК — белок необходим 2 *М* NaCl; при такой концентрации соли ни ДНК, ни белок не удерживаются ионообменником. Каким образом можно очистить этот белок?

8-3. При получении гибридной ДНК путем ренатурации денатурированной ДНК обычно имеется некоторое количество неренатурированной ДНК. Каким образом можно его удалить?

8-4. Имеются две молекулы ДНК, молекулярная масса которых равна $6\cdot10^6$, причем одна из них кольцевая, а другая — линейная. Какая молекула будет элюироваться первой с колонки с агарозой? Что можно сказать о нативной и денатурированной рибосомных РНК? (Рибосомная РНК имеет выраженную вторичную структуру.)

8-5. Методика очистки данного фермента предусматривает использование гель-проникающей хроматографии. Пытаясь увеличить количество получаемого вещества, вы используете образец с концентрацией в 10 раз большей, чем обычно применяется в этой методике. Основная часть ферментативной активности при этом элюируется в холостом объеме. Объясните, что произошло?

Будет ли, как правило, необходимым увеличивать диаметр колонки при увеличении количества наносимого вещества? Будет ли увеличиваться длина колонки? Нужно ли увеличивать оба размера?

8-6. При хроматографии на бумаге вещества А, Б, В и Г в различных системах растворителей имеют следующие значения R_f:

	Бутанол—H_2O	Изопропанол—HCl	Этанол	Уксусная кислота
А	0,23	0,31	0,42	0,09
Б	0,24	0,20	0,51	0,62
В	0,38	0,58	0,40	0,64
Г	0,41	0,56	0,53	0,10

Укажите наилучший способ разделения веществ А — Г.

8-7. Смесь белков (20 мг) нанесли на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой. Известно, что 30% белка составляет фермент X. После элюирования колонки общее количество белка во всех фракциях составило 18,9 мг. При этом не

было обнаружено активности, отвечающей ферменту X. Объясните по возможности потерю ферментативной активности.

8-8. Молекула ДНК с молекулярной массой двухцепочечной части $6 \cdot 10^6$ дальтон и одноцепочечным участком с длиной, равной двухцепочечной части, адсорбируется на гидроксиапатите. Принимая во внимание, что в этих пределах хроматографическое поведение мало зависит от молекулярной массы, что можно ожидать при промывании колонки с возрастающим градиентом концентрации PO_4^{3-}, т. е. будет ли молекула элюироваться в одноцепочечном или в двухцепочечном диапазоне концентрации или где-нибудь в другом месте?

8-9. Известно, что фермент проявляет активность в присутствии высокой концентрации ионов Mg^{2+}. При удалении ионов магния белок необратимо денатурирует. Предположим, что в принятой схеме очистки вы должны применить как ионообменную, так и гель-проникающую хроматографию, причем в обоих случаях фермент теряет активность. Объясните, в результате чего это могло произойти. Какую модификацию, с вашей точки зрения, следует применить, чтобы исправить положение?

8-10. Некоторые лекарственные вещества, такие, как морфин, связываются со специфическими рецепторами в нервных тканях. Предложите методику частичной очистки этих рецепторов.

8-11. Два белка имеют одинаковые молекулярные веса. При pH 5,5 оба они обладают выраженной вторичной структурой, имея при этом по меньшей мере 75% α-спиралей. При pH 8,5 один из них теряет структуру, полностью переходя в беспорядочную спираль; при pH 5,5 его структура вновь образуется. Опишите методику разделения этих белков.

ГЛАВА 9

Электрофорез

Большинство биологических полимеров содержат заряженные группы, поэтому они способны двигаться в электрическом поле. Движение частиц в растворителе под влиянием электрического поля называется электрофорезом.

Скорость перемещения макромолекул в электрическом поле служит их полезной характеристикой. Это свойство можно использовать для определения молекулярной массы белков, для различия макромолекул на основе их общего заряда или формы, для определения изменений в аминокислотном составе при замене заряженной аминокислоты на незаряженную и наоборот, а также для количественного разделения различных видов молекул. Методы, при помощи которых получаются эти результаты, рассматриваются в данной главе.

Теория электрофореза

Подробная теория электрофореза очень сложна и к настоящему моменту еще до конца не разработана. Для понимания принципов использования метода в различных целях достаточно его простого описания.

Во многом электрофорез напоминает седиментацию (гл. 11): к объекту прикладывается сила, которой оказывает сопротивление вязкость среды. Если частица с зарядом q суспендирована в непроводящей среде и находится в электрическом поле E, она будет двигаться с постоянной скоростью v, определяемой соотношением между электрической силой Eq и сопротивлением вязкой среды fv, где f — коэффициент трения. Отсюда

$$Eq = fv. \tag{1}$$

Подвижность u определяется как скорость на единицу поля, или

$$u = v/E = q/f. \tag{2}$$

Поскольку подвижность зависит от коэффициента трения, который является функцией некоторых физических параметров молекул, в принципе значение u дает информацию о величине и форме молекулы. Однако среда, в которой происходит движение, обычно не изолятор, а электролит, состоящий из заряженных ионов, что вносит дополнительно большие затруднения. Хотя заряженная частица, находящаяся в электролите, притягивает ионы

и поэтому окружена ионной атмосферой, экранирующей ее от приложенного электрического поля, все же эта ионная атмосфера частично нарушается как полем, так и движением частицы сквозь среду. В настоящее время теория элекрофореза не в состоянии точно описать ни эти, ни ряд других процессов, поэтому данные электрофореза не могут трактоваться с точки зрения *детальной* информации о макромолекулярной структуре. Тем не менее метод находит исключительно широкое применение для аналитических и препаративных целей *, что вызвано его возможностями для разделения различных молекул. Хотя теория может дать общие сведения для выбора условий электрофореза (например, что подвижность увеличивается с ростом q, уменьшается с увеличением f и равна нулю для незаряженных молекул), на практике оптимальные условия почти всегда подбираются эмпирическим путем.

Виды электрофореза

Существует три типа электрофореза: *с подвижной границей, зональный* и *непрерывный*.

В электрофорезе с подвижной границей макромолекулы присутствуют во всем объеме раствора, и положение молекул (практически граница, отделяющая растворы от растворителя) как функцию времени определяют с помощью шлиреновской оптики (гл. 11). Этот метод, во многом сходный с граничной седиментацией, является аналитическим методом, использующимся в первую очередь для определения подвижностей и изоэлектрических точек белков, однако в связи с тем, что здесь обычно трудно количественно определить подвижности, метод электрофореза с подвижной границей используется сравнительно редко.

В зональном электрофорезе раствор наносят в виде пятна или полосы, и частицы мигрируют через растворитель, который почти всегда содержится в инертной гомогенной среде, такой, как бумага или гель. Метод используется для анализа смесей, определения чистоты, анализа изменений в подвижности и (или) конформации, а также для очистки. Количественное определение подвижности здесь не проводится, так как практически невозможно

* Часто даются ссылки, для каких целей используется данная методика — для препаративных или аналитических. Препаративная методика разработана для получения относительно больших количеств чистого материала, который может использоваться в дальнейших экспериментах. Аналитическая процедура применяется для контроля чистоты, определения количества компонентов в смеси и, если возможно, оценки их соотношения, обнаружения изменений в заряде и т. д., т. е. дает информацию по отдельным вопросам.

рассчитать ее теоретически с учетом разнообразных эффектов материала носителя.

В непрерывном электрофорезе образец также наносят в виде зоны, за исключением того, что он прибавляется постоянно.

В последующих разделах будут описаны различные методики электрофореза. Электрофорез с подвижной границей рассматриваться не будет, поскольку он используется крайне редко. Информацию об этом методе можно найти в литературе, список которой приведен в конце главы.

Зональный электрофорез

В зональном электрофорезе пятно или тонкий слой раствора, нанесенного на полутвердый или гелеобразный материал, помещают в электрическое поле, в результате чего молекулы перемещаются по или через материал носителя. Поскольку образец наносится в виде зоны, для полноты разделения приходится использовать небольшие количества вещества. В первую очередь функцией носителя является предотвращение механических воздействий и конвекции, которая происходит в результате как температурных изменений, так и высокой плотности концентрированных растворов макромолекул. Однако носитель иногда может адсорбировать молекулы различного типа или действовать в качестве молекулярного сита, приводя тем самым к хроматографическим эффектам (гл. 8), что может или помогать разделению или ухудшать его. Методы использования различных материалов в качестве носителей описаны в следующих разделах.

Электрофорез на бумаге

На рис. 9-1 показана схема типичного устройства для низковольтного (20 В/см) электрофореза на бумаге. Полоску бумаги сначала погружают в буферный раствор, а затем помещают в камеру, как показано на рисунке. Далее образец наносят либо в виде пятна, либо в виде линии. После окончания разделения бумагу вынимают и высушивают. Если образец содержит достаточное количество вещества, оно может быть обнаружено по его окраске, по флуоресценции или при окрашивании различными красителями. Если требуется количественное определение, вещество можно элюировать и определить спектрофотометрически. Так как элюирование красителя редко бывает количественным, точность такого определения составляет около 20%. Если образец радиоактивен, пятна можно локализовать путем разрезания бумаги и определения радиоактивности (гл. 5) или с помощью авторадиографии целого листа с использованием рентгеновской плен-

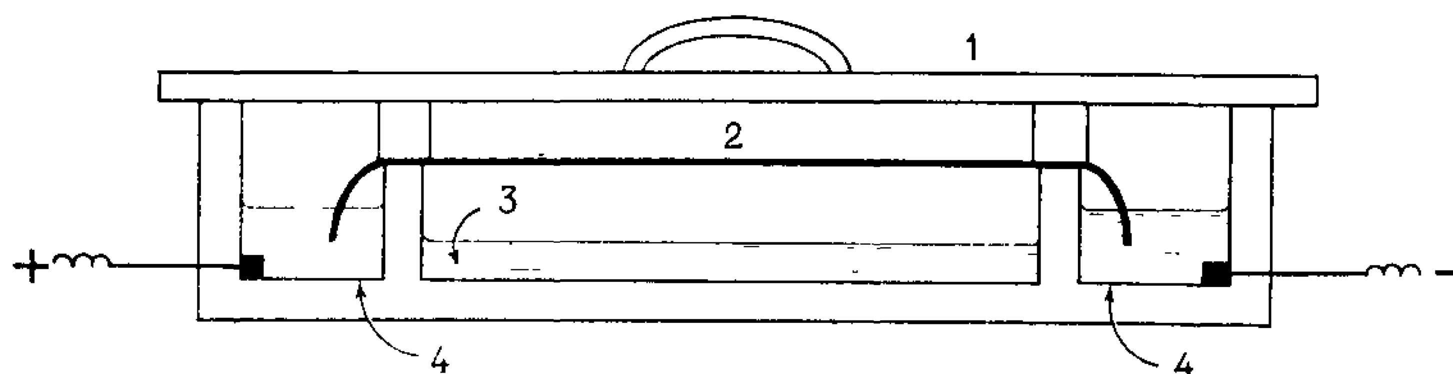


РИС. 9-1.

Аппарат для низковольтного электрофореза на бумаге.

Образец наносили на бумагу в виде пятна, как при хроматографии на бумаге (см. рис. 8-6), но обычно близко к середине листа. Бумагу насыщали буфером, после чего оба ее конца погружали в емкости с буфером для осуществления электрического контакта с электродами. Систему закрывали для предотвращения высыхания бумаги. После истечения предварительно определенного времени бумагу вынимали и высушивали. *1* — крышка с ручкой; *2* — бумага; *3* — вода для поддержания влажности; *4* — буфер.

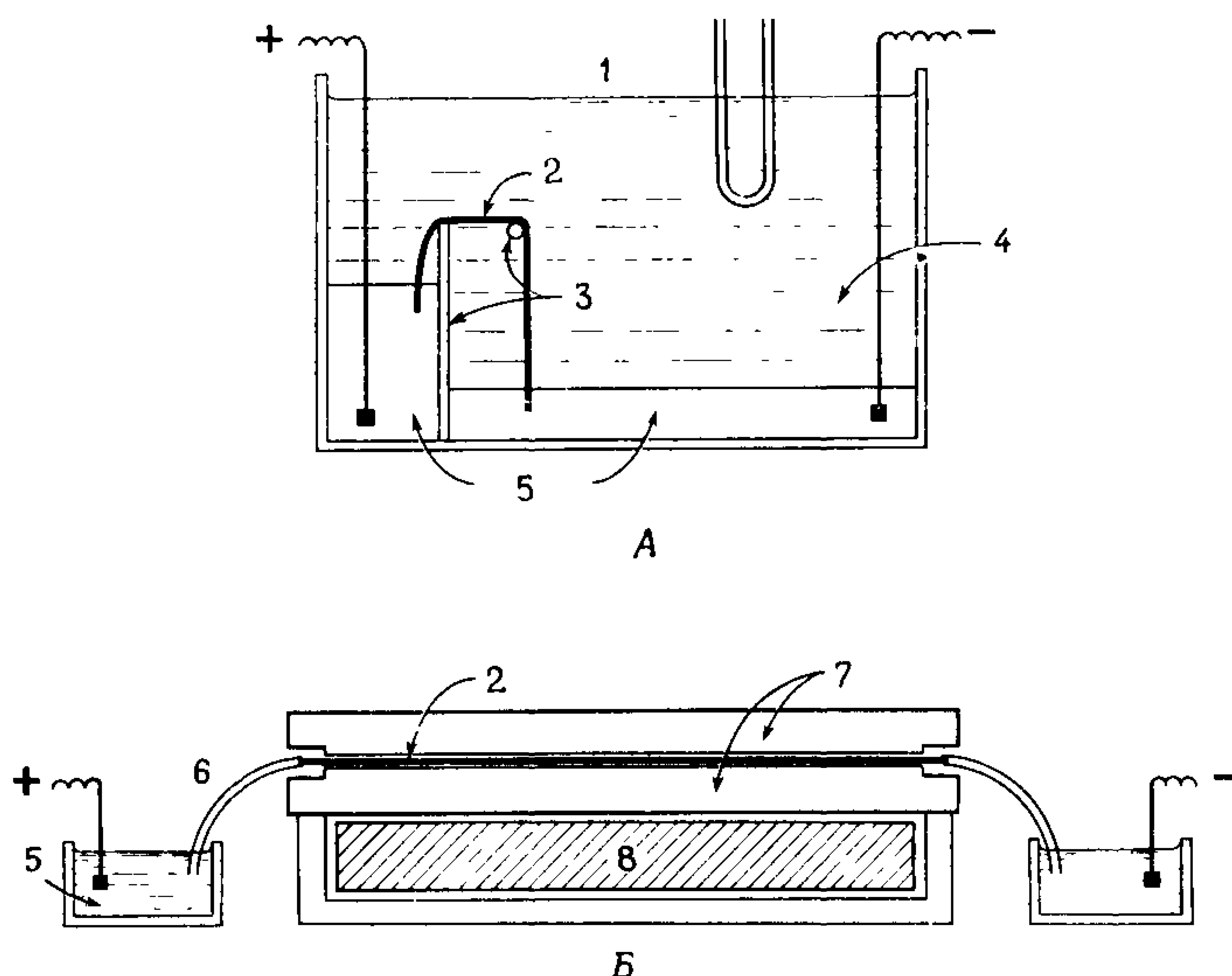


РИС. 9-2.

Два типа аппаратов для высоковольтного электрофореза.

Поскольку более сильный ток вызывает значительное разогревание, способное разрушить образец, бумагу либо погружают в охлаждающую жидкость, либо помещают между двумя охлаждающими пластинами. Заполненный воздухом мешок поддерживает охлаждающие пластины для предотвращения прогибания. *А* — метод погружения; *Б* — метод закрытой бумаги. *1* — охлаждающий змеевик; *2* — бумага; *3* — опора; *4* — несмешивающаяся охлаждающая жидкость; *5* — буфер; *6* — фитиль; *7* — охлаждающие пластины; *8* — мешок, заполненный воздухом.

ки (гл. 6). В некоторых случаях оказывается полезным прием, заключающийся в комбинации окрашивания с радиоактивной меткой, что позволяет определить, какие вещества являются радиоактивными. Низковольтный электрофорез на бумаге чаще всего используется для анализа смесей белков, которые плохо разделяются хроматографическими методами. Однако этот метод уступает гель-электрофорезу (см. ниже).

Низковольтный электрофорез малоэффективен для небольших молекул (например, аминокислот и нуклеотидов), поскольку из-за малого заряда они обладают низкой подвижностью и, следовательно, медленно делятся. Из-за малого размера молекул имеет место значительное размывание зон за счет диффузии. В *высоковольтном электрофорезе* скорость разделения увеличивается за счет использования градиента потенциала 200 В/см. Высокое напряжение обусловливает большую силу тока, бумага нагревается, поэтому здесь необходимо охлаждение. Для охлаждения бумагу погружают в большой объем несмешивающейся и не проводящей ток жидкости или прижимают ее к охлаждающей поверхности. Метод погружения (рис. 9-2) используется редко, поскольку применяемые охлаждающие жидкости (например, толуол, четыреххлористый углерод или различные масла) являются токсичными и в ряде случаев огнеопасны. *Метод закрытой бумаги,* показанный на рис. 9-2, находит более широкое применение. Заметим, что в данном случае бумага не погружается в буфер.

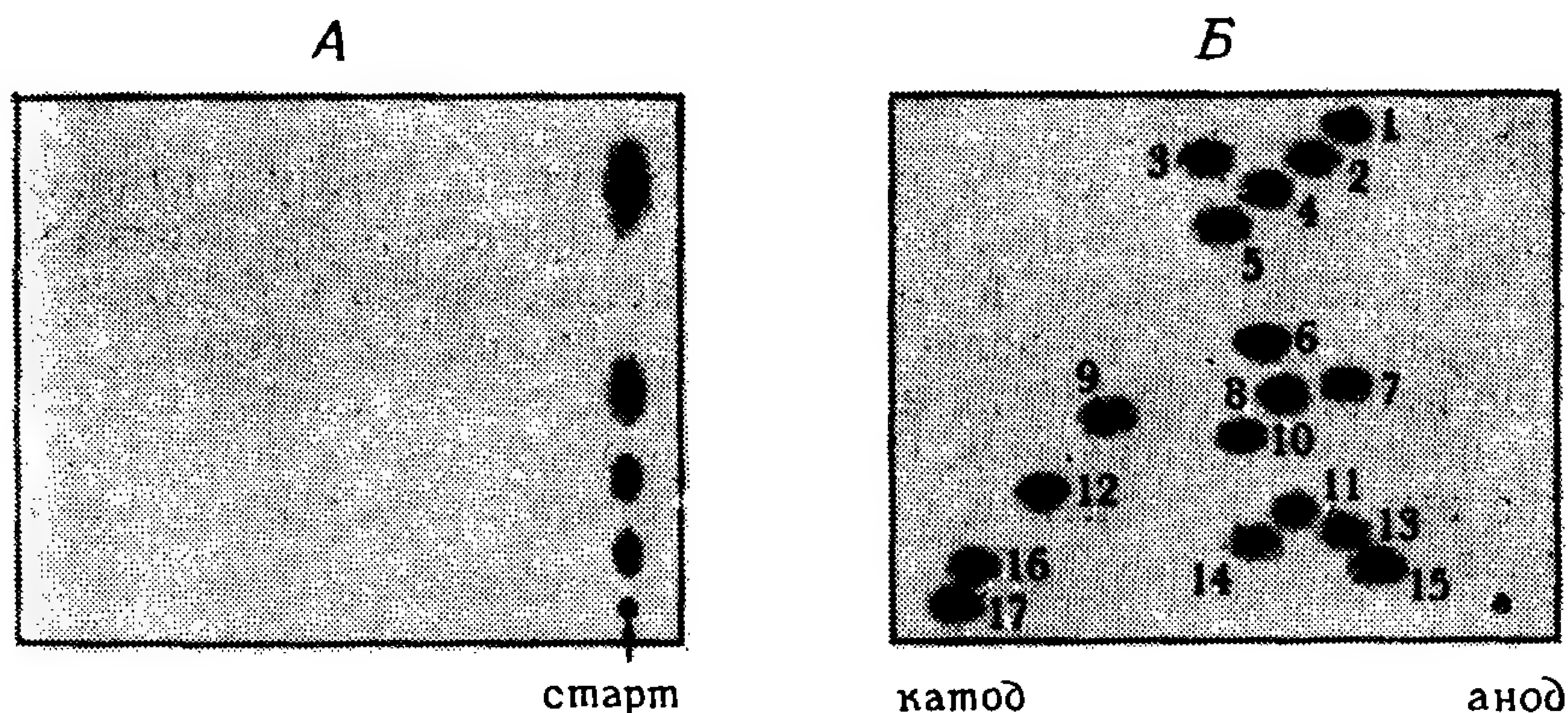


РИС. 9-3.

Применение двумерной хроматографии в комбинации с электрофорезом для разделения аминокислот.

А — только хроматография; *Б* — хроматография с последующим электрофорезом. Хроматография проведена в системе лутидин—вода (2 : 1); электрофорез при рН 2,25. Номерами обозначены следующие пятна: *1* — триптофан, *2* — тирозин, *3* — лейцин, *4* — фенилаланин, *5* — метионин, *6* — треонин, *7* — оксипролин, *8* — пролин, *9* — аланин, *10* — серин, *11* — глутамин, *12* — глицин, *13* — глутаминовая кислота, *14* — аспарагин, *15* — аспарагиновая кислота, *16* — аргинин, *17* — лизин.

После окончания электрофореза бумагу высушивают, и вещества определяют так же, как и при низковольтном электрофорезе.

Высоковольтный электрофорез на бумаге имеет большую ценность для разделения аминокислот и пептидов. Поскольку полное разделение смесей не всегда возможно при использовании одного высоковольтного электрофореза, его часто используют в сочетании с хроматографией; этот метод известен под названием *двумерного разделения.* Образец вначале подвергают электрофорезу, а затем хроматографируют под прямым углом или наоборот; пример такого разделения приведен на рис. 9.3.

Электрофорез на полосках ацетата целлюлозы

Многие биологические макромолекулы адсорбируются на целлюлозе (т. е. на бумаге) за счет гидроксильных групп целлюлозы. Адсорбция препятствует движению (гл. 9) и поэтому вызывает вытягивание пятен или полос, что ухудшает разделение. Этого можно избежать, если вместо бумаги использовать мембрану из ацетата целлюлозы, так как в нем большинство гидроксильных групп превращено в ацетатные, которые не проявляют адсорбирующих свойств. Помимо того что разделение при этом улучшается, оно также ускоряется, и возможно использовать более низкое напряжение. Меньший размер пятен означает, что вещество в них находится в большей концентрации, поэтому его легче обнаружить. Низкая адсорбция ацетатом целлюлозы приводит к меньшему фону при окрашивании, что увеличивает чувствительность обнаружения.

К другим достоинствам ацетата целлюлозы следует отнести его прозрачность, дающую возможность определять эти вещества спектрофотометрически, и хорошую растворимость в различных растворителях, что позволяет легко элюировать вещества.

По простоте обращения и степени разделения ацетат целлюлозы не имеет себе равных. Однако при необходимости получить особо высокое разделение, следует выбрать метод гель-электрофореза.

Гель-электрофорез

Лучшего разделения, в частности, белков и нуклеиновых кислот, можно достигнуть, если в качестве носителя использовать гели крахмала, полиакриламида, агарозы и агарозы — акриламида. Причины этого не совсем ясны, однако такой эффект, очевидно, связан с пониженной диффузией в сетке геля и разделяющим действием гель-проникающей хроматографии (эффект «молекулярного сита»).

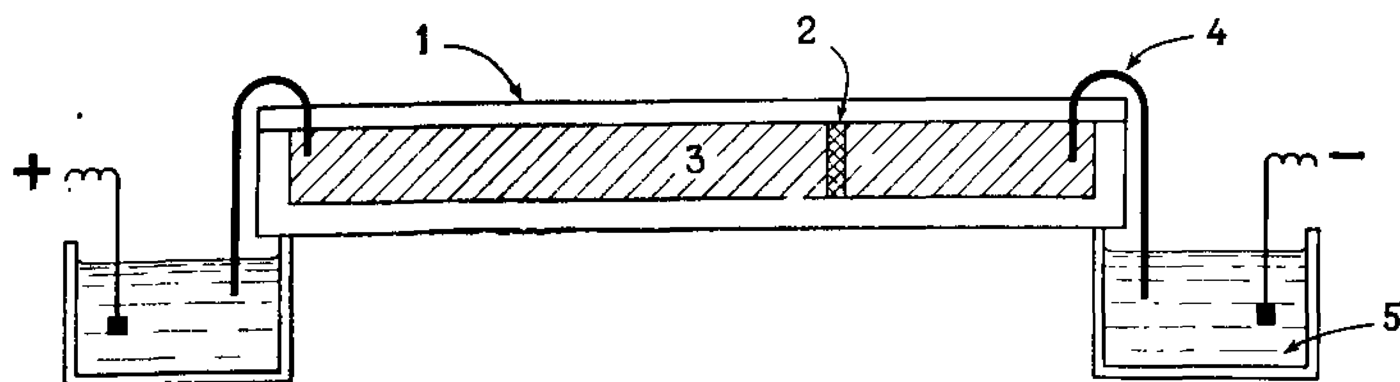


РИС. 9-4.

Устройство для электрофореза в крахмальном геле.

Гель образуется на пластинке при набухании зерен крахмала в буфере. Гель надрезают и в этот надрез вводят образец. Систему заливают воском для предотвращения высыхания. *1* — воск; *2* — образец; *3* — крахмальный гель; *4* — проводник из бумаги; *5* — буфер.



РИС. 9-5.

Электрофореграмма при разделении белков в крахмальном геле.

После окончания электрофореза гель окрашивают для обнаружения белков. Заметим, что белки двигаются как к аноду, так и к катоду в зависимости от их заряда.

Первоначально для гель-электрофореза применяли *крахмальный гель*. На рис. 9.4 изображено типичное устройство для электрофореза в крахмальном геле. Гель представляет собой пасту из картофельного крахмала, зерна которого разрушены нагреванием в буфере. При горизонтальном положении геля, как показано на рисунке, образец наносится в щель, прорезанную лезвием бритвы, в виде раствора или смеси с зернами крахмала. Щель заливают воском или жиром, после чего прикладывают напряжение. После окончания электрофореза полутвердый гель отделяют и часто разрезают на два или три слоя, каждый из которых окрашивается различным способом. Разнообразные компоненты проявляются в геле в виде серии полос (рис. 9-5). В настоящее время крахмальный гель используется редко, поскольку более удобным оказался полиакриламидный гель.

Полиакриламидный гель заменил крахмальный гель потому, что при его использовании можно контролировать эффект молекулярного сита с помощью изменения концентрации геля, а адсорбция белков в нем весьма мала. Полиакриламид — наиболее эффективный носитель для электрофореза белков и небольших молекул РНК. (Для нуклеиновых кислот, размер молекул которых больше размера пор полиакриламида, лучше использовать агарозу или агарозу — акриламид.) Полиакриламидный гель получается при сшивании акриламида N,N′-метилен-*бис*-акрила-

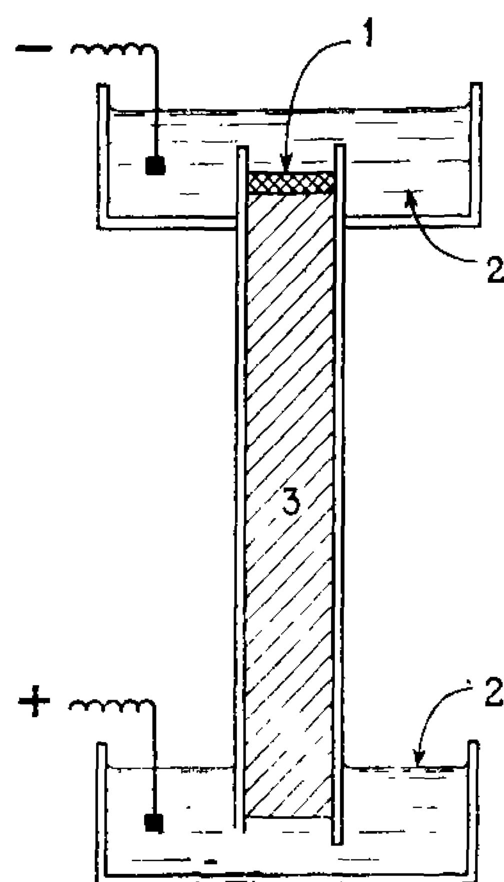


РИС. **9-6.**

Прибор для гель-электрофореза на колонке.

Гель полимеризуется непосредственно в колонке, которую потом соединяют с сосудами с буфером. Образец суспендируют в концентрированном растворе сахарозы и наносят на поверхность геля в виде тонкого слоя с помощью пипетки. После окончания электрофореза гель извлекают из колонки и затем либо окрашивают для обнаружения зон, либо (при использовании радиоактивного образца) разрезают на поперечные части и измеряют радиоактивность в каждом таком срезе. *1* — образец; *2* — буфер; *3* — гель.

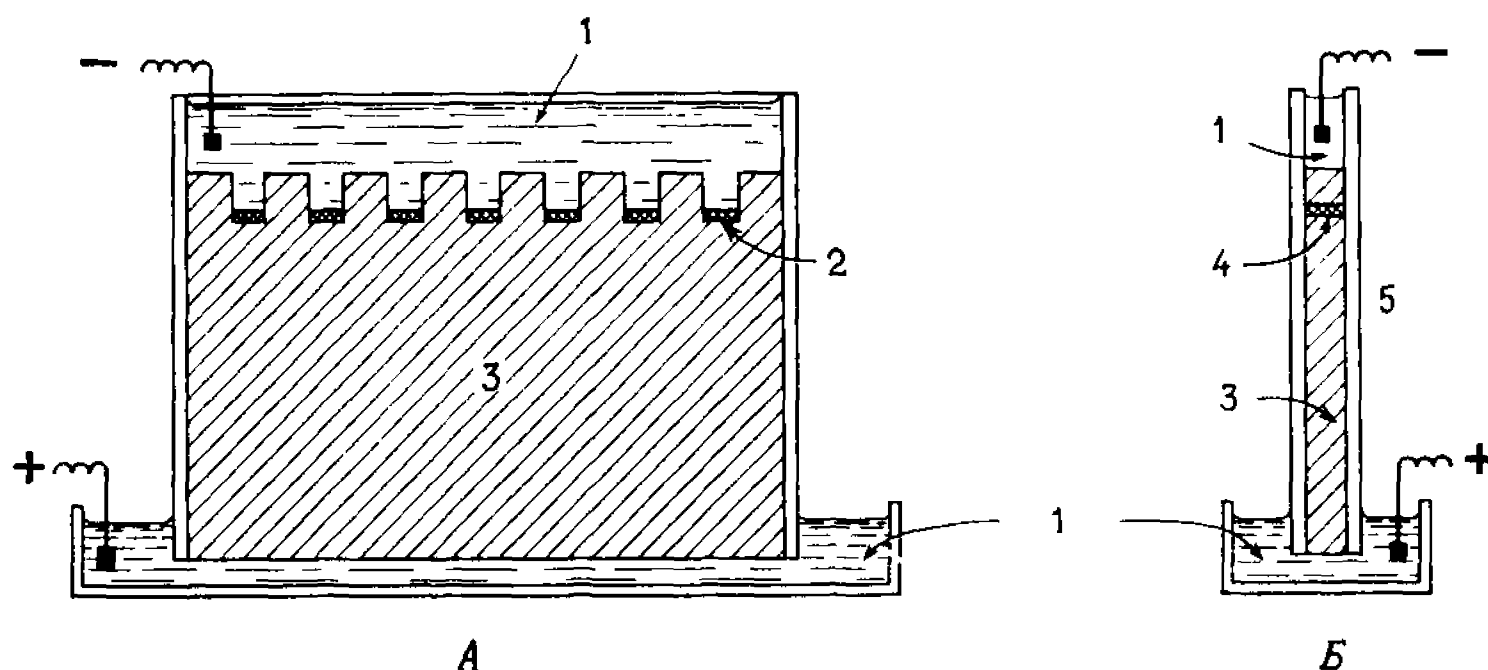


РИС. **9-7.**

Прибор для электрофореза на пластинках геля, позволяющий проводить одновременный анализ семи образцов.

Гель полимеризуется непосредственно в рабочей емкости. Обычно при полимеризации по верхнему краю геля формируются углубления для нанесения образцов. После электрофореза пластинку окрашивают либо при добавлении красителя в верхний буфер, либо погружением геля в раствор красителя после удаления пластинки из рамки. Избыток красителя удаляют либо промыванием, либо электрофорезом. *А* — вид спереди; *Б* — вид сбоку. *1* — буфер; *2* — образцы; *3* — гель; *4* — образец; *5* — пластмассовая рамка.

мидом непосредственно в контейнере, предназначенном для проведения электрофореза.

Электрофорез в полиакриламидном геле проводят или в колонках с гелем, или на пластинках геля (рис. 9.6 и 9.7). В последнее время колонки быстро вытесняются пластинками геля, использование которых позволяет одновременно на одной пластинке анализировать большое число образцов.

Электрофорез в полиакриламидном геле, вероятно, является наиболее гибкой и используемой электрофоретической системой

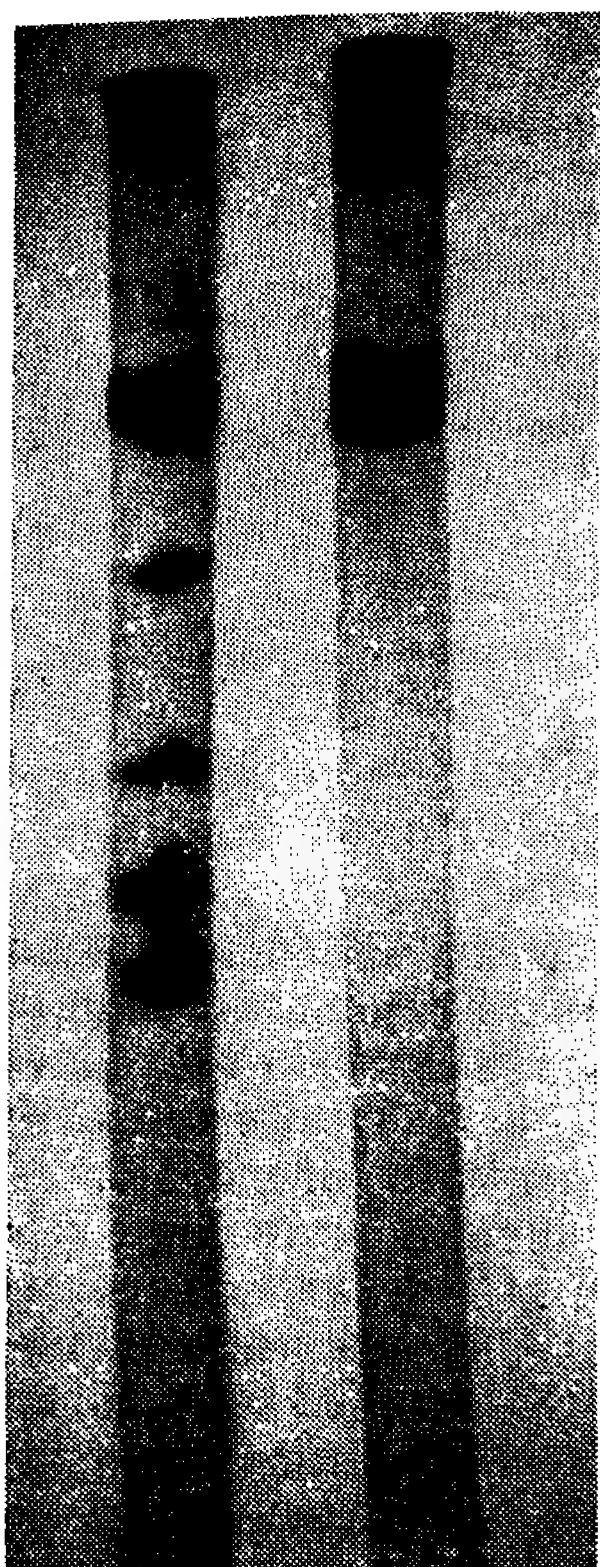


РИС. 9-8.

Электрофорез белков в ДСН.

Разрушенный вирус полиомы (слева) и белок капсида вируса полиомы (справа) обрабатывали ДСН и меркаптоэтанолом, после чего раздельно анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле, содержащем ДСН. Для обнаружения белков гели окрашивали. Зоны, идентифицированные как гистоны (две верхние зоны), обнаружены только в целом вирусе. Поскольку вирус содержит РНК, этот факт использован для доказательства того, что клеточные гистоны связаны с вирусной РНК. (Любезно предоставил Вильям Мураками.)

для анализа и разделения макромолекул. Для специальных целей разработаны два варианта, описанные ниже.

ДСН-гель-электрофорез. Клаус Вебер и Мери Осборн показали, что молекулярную массу многих белков можно определить с помощью измерения их подвижности в полиакриламидном геле, содержащем детергент — додецилсульфат натрия (ДСН). При нейтральном pH в 1%-ном ДСН и 0,1 М меркаптоэтаноле большинство многоцепочечных белков связывает ДСН и диссоциирует, дисульфидные связи разрываются меркаптоэтанолом, вторичная структура исчезает, в результате чего комплексы, состоящие из субъединиц белка и ДСН, приобретают беспорядочную конфигурацию. Обработанные таким образом белки имеют одну и ту же форму и одинаковое отношение заряд/масса. Это объясняется тем, что количество ДСН, связываемое на единицу массы белка, всегда постоянно и равно 1,4 г ДСН на 1 г белка; таким образом, заряд в большей степени определяется ДСН, чем различными зарядами, присущими аминокислотам. Таким образом достига-

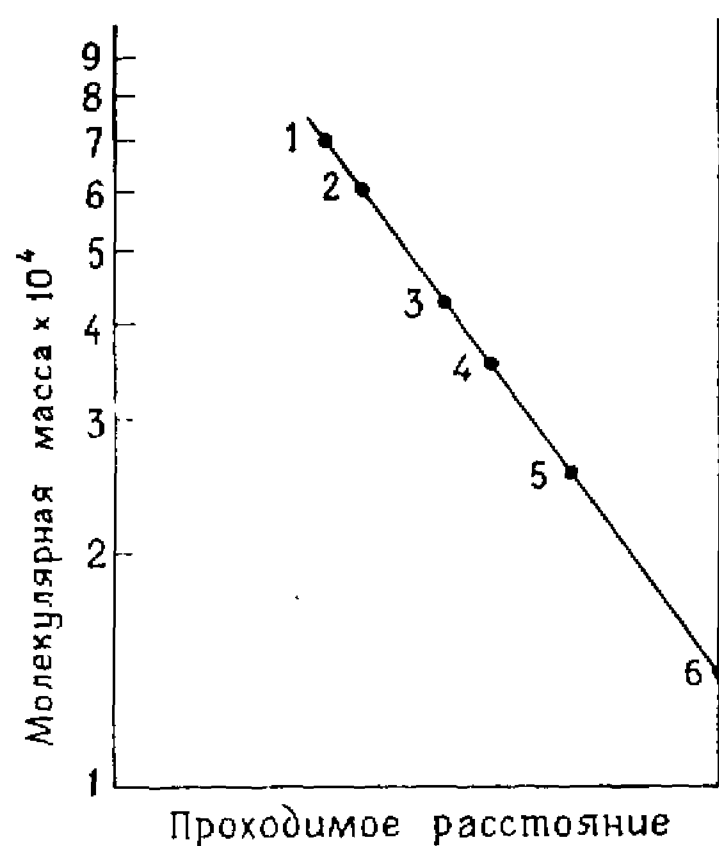


РИС. 9-9.

Типичная полулогарифмическая зависимость M от значения подвижности для определения молекулярной массы методом электрофореза в ДСН-полиакриламидном геле.

Белки предварительно восстанавливали для удаления дисульфидных связей. 1 — альбумин бычьей сыворотки; 2 — каталаза; 3 — яичный альбумин; 4 — карбоксипептидаза А; 5 — химотрипсиноген; 6 — лизоцим.

ется зависимость подвижности только от молекулярной массы за счет свойств геля быть молекулярным ситом. Если на колонке с гелем подвергнуть электрофорезу серию белков с известной молекулярной массой, то получим серию полос (рис. 9.8), причем график зависимости пройденного расстояния от $\lg M$ представляет собой прямую линию (рис. 9.9). Следовательно, если белок с неизвестной молекулярной массой подвергнуть электрофорезу с двумя белками известной молекулярной массы, неизвестная молекулярная масса может быть рассчитана с точностью от 5 до 10%. Бóльшая точность получается, когда неизвестная молекулярная масса находится между известными. Несомненно, этот метод является на сегодняшний день наиболее распространенным для определения молекулярной массы субъединиц (следует заметить, что тонкослойная гель-проникающая хроматография, вероятно, будет иметь такую же значимость, см. гл. 8).

Заметим, что ДСН-гель-элекрофорез можно также использовать для определения наличия S — S-групп, поскольку в присутствии этих групп подвижность будет зависеть от того, обработан ли белок агентом, расщепляющим S — S-связь, т. е. меркаптоэтанолом. Приложение для решения этой проблемы метода вискозиметрии изложено в гл. 13.

В ранних работах для разрушения вторичной и третичной структуры белков использовали растворы мочевины с концентрацией от 7,0 до 12,0 М, однако сейчас такую обработку проводят ДСН.

Электрофорез нуклеиновых кислот в полиакриламидном и полиакриламид-агарозном гелях. При электрофорезе нуклеиновых кислот основным фактором разделения является эффект молекулярного сита, поскольку отношение заряд/масса приблизительно одно и то же для всех полинуклеотидов. Следовательно,

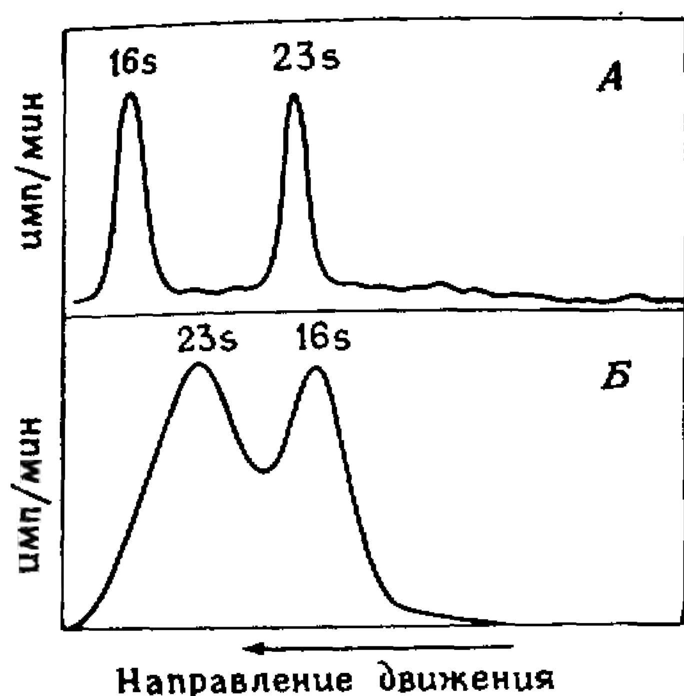


РИС. 9-10.

Разделение двух типов рибосомной РНК (16s и 23s) методами электрофореза в полиакриламидном геле и седиментации в градиенте плотности сахарозы.

Отметим, что электрофоретические зоны уже, чем седиментационные; кроме того, положение зон двух различных классов молекул оказывается обратным. *А* — электрофорез; *Б* — седиментация.

небольшие молекулы движутся быстрее, чем большие. Поскольку природные молекулы нуклеиновых кислот очень велики, размер пор геля должен быть большим, т. е. гель должен быть разбавленным. Для придания гелям прочности, особенно при разделении больших молекул ($M>5\cdot10^6$), добавляют агарозу (высокопористый полисахарид); иногда используют одну агарозу. Электрофорез проводят на колонках или пластинках геля. Для молекул РНК (например, рибосомной или информационной РНК) метод дает гораздо лучшее разделение, чем зональное центрифугирование (рис. 9-10), поэтому часто в таких случаях выбирают электрофорез. Более того, проходимое расстояние пропорционально $\lg(1/M)$, т. е. возможно определить M при использовании двух параллельных образцов с известными молекулярными массами. Разделение в полиакриламиде и агарозе дает также хорошие результаты для одноцепочечных ДНК с молекулярной массой не выше $50\cdot10^6$. Однако из-за большого размера двухцепочечной ДНК нельзя получить гель, размеры пор которого позволяют разделять ДНК с M более $8\cdot10^6$, хотя для ДНК с меньшей молекулярной массой разделение происходит очень хорошо. На рис. 9.11 показана пластинка геля агарозы с разделенными молекулами ДНК.

По неизвестным причинам одноцепочечные молекулы ДНК в некоторых буферных системах разделяются не только по размерам, но и по ряду других параметров. Например, две полинуклеотидные цепи, полученные при денатурации ДНК некоторых фагов *E. coli*, разделяются в 0,6%-ной агарозе с использованием *трис*-фосфатного буфера.

Другим интересным применением электрофореза в полиакриламидном геле служит разделение кольцевых и линейных молекул ДНК. Можно подобрать такую концентрацию геля, при которой в гель будут проникать только линейные, но не кольцевые молекулы ДНК одной молекулярной массы. Следовательно, кольцевые молекулы будут оставаться на старте. Это явление,

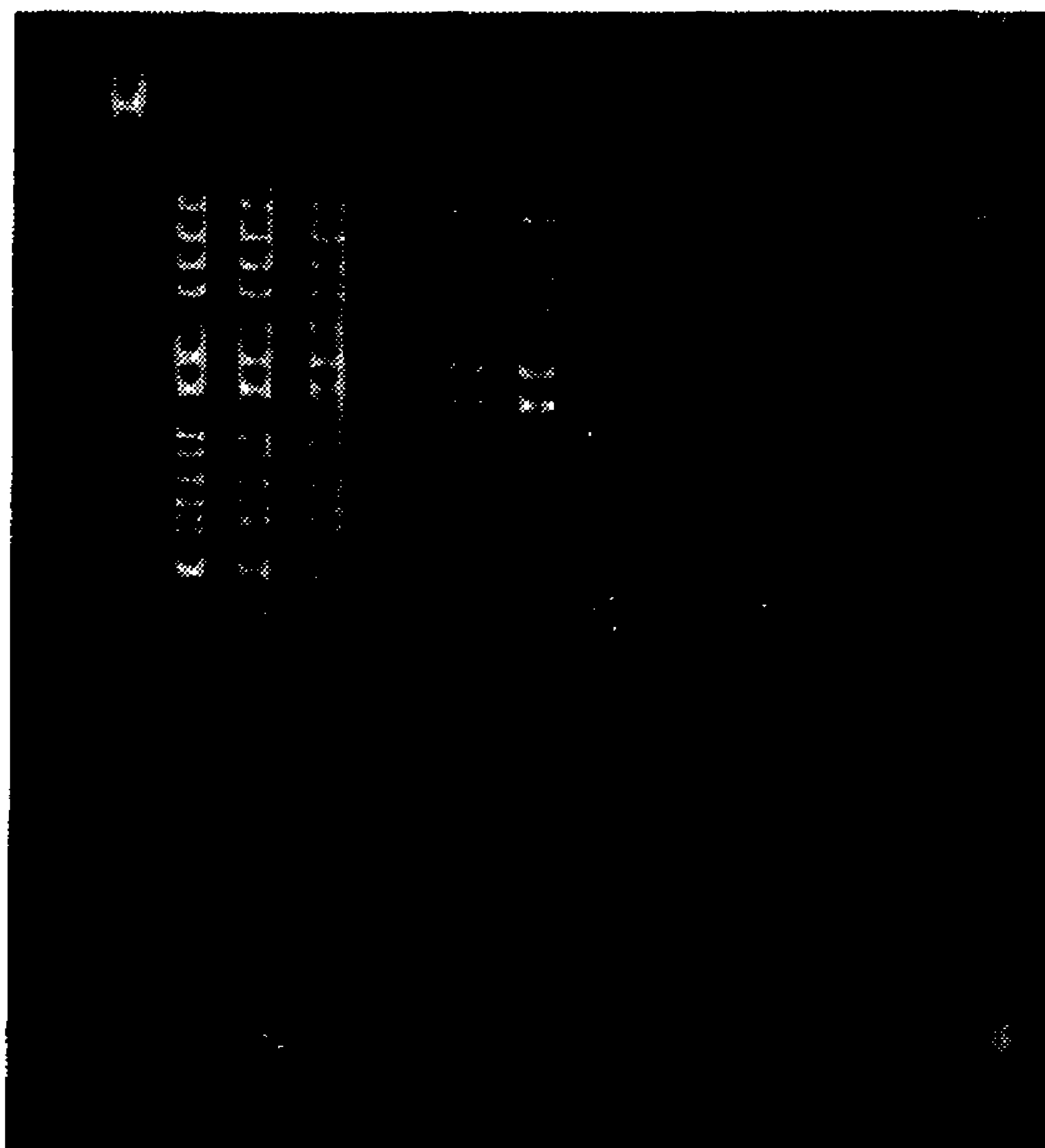


РИС. 9-11.

Электрофорез фрагментов ДНК на пластинке геля.

Фрагменты ДНК получены при обработке различных ДНК фага *para* λ Hin2 и Hin3 рестриктазами. После электрофореза гель пропитывали раствором бромида этидия, облучали возбуждающим светом и фотографировали, фиксируя флуоресценцию красителя, связанного с ДНК. Так как при наличии связывания флуоресценция значительно усиливается, сам гель не дает заметной флуоресценции. Каждый вертикальный набор зон соответствует индивидуальной ДНК. (Любезно предоставил Роберт Шлейф.)

возможно, основано на том, что размер пор настолько мал, что лишь молекулы линейной формы, *входящие в поры по ширине,* могут проникать в гель. К настоящему времени этот метод еще не нашел широкого применения.

Зоны нуклеиновых кислот можно обнаружить в геле различными способами. Радиоактивность обычно измеряют путем разрезания геля, солюбилизации в 0,5 М NaOH или H_2O_2 и использования сцинтилляционного счетчика. Если вещество имеет высокую молекулярную массу, то разрезание геля затруднено, поскольку в таких случаях используют очень мягкий гель для достижения большого размера пор. Двухцепочечную ДНК легче обнаружить при окрашивании флуоресцентным красителем бромидом этидия (рис. 9-11), который имеет повышенный квантовый выход (гл. 15) при связывании с нативной ДНК. Краситель Stains-All обладает интересным свойством давать различные окраски с ДНК, РНК и белками.

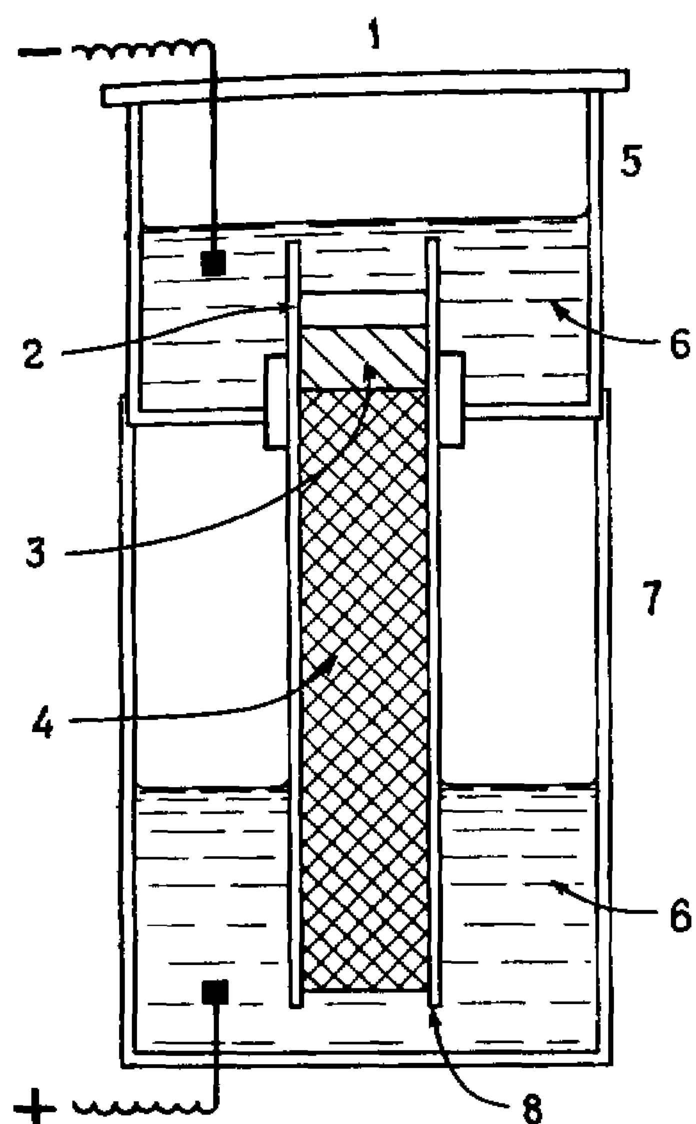


РИС. 9-12.

Прибор для диск-электрофореза.

Гели полимеризуются в колонке раздельно, после чего их помещают в сосуд с буфером. Иногда верхний гель не используют; в этом случае образец в плотном растворе сахарозы наносят слоем на гель-прокладку, но под буфер. После электрофореза гель извлекают и окрашивают, или, если образец был радиоактивным, разрезают поперек на части и каждый срез анализируют в сцинтилляционном счетчике. В некоторых случаях (рис. 9-13) гель разрезают вертикально и анализируют методом авторадиографии. Устройство для пластинок геля (рис. 9-7) может быть использовано также и для диск-электрофореза. *1* — крышка; *2* — образец или область образца; *3* — гель-прокладка; *4* — разделяющий гель; *5* — верхний сосуд; *6* — буфер; *7* — нижний сосуд; *8* — стеклянная трубка.

Диск-электрофорез в полиакриламидном геле

Для достижения максимального разделения используют диск-электрофорез — важное усовершенствование зонального электрофореза. (Как будет видно, термин «диск» относится не к форме полос, получаемых в этом методе, а к тому, что в системе используются неоднородные значения pH, что приводит к *прерывистому* напряжению.) Метод состоит в том, что первоначальный тонкий слой образца (1—2 мм) концентрируется в сверхтонкую стартовую зону толщиной от 1 до 100 мкм, как показано на рис. 9-12. Заметим, что гель находится в вертикальной колонке и представляет собой три отдельные области: верхнюю, или область образца, среднюю, называемую прокладкой, и нижнюю, состоящую из собственно разделяющего геля. Область образца и гель-прокладка имеют меньшую концентрацию (больший размер пор), чем разделяющий гель, и готовятся в буфере с низкой ионной силой и различными значениями pH. Бóльший размер пор верхних слоев геля означает, что молекулы в них задерживаются меньше, двигаясь при этом быстрее, чем в нижнем геле. Кроме того, меньшая ионная сила обусловливает большее электрическое сопротивление, поэтому электрическое поле (В/см) в верхнем геле больше, что также приводит к большей скорости движения молекул в верхнем геле по сравнению с нижним гелем. Соотношение значений pH по слоям приводит к такому же влиянию на подвижность. Быстрое движение через верхние слои геля приводит к накопле-

нию вещества на границе между прокладкой и разделяющим гелем. Однако следует заметить, что в геле-прокладке компоненты с близкими подвижностями все же группируются. [Этот процесс называется стэкинг-взаимодействием (stacking), поэтому гель-прокладку иногда называют *стэкинг-гелем*.] При движении молекул через разделяющий гель образуются различные зоны в соответствии с подвижностями. После окончания разделения гель удаляют из стеклянной трубки. Для идентификации зон существует ряд методов. Гель можно окрашивать путем погружения в раствор красителя с последующим тщательным промыванием для удаления несвязанного красителя. (В некоторых случаях краситель удаляют с помощью электрофореза. Это можно осуществить благодаря тому, что краситель ковалентно связывается с белком, который в свою очередь связан с гелем. Несвязанный краситель свободно выходит из геля при повторном приложении электрического поля.) При необходимости гель можно фотографировать; если же требуется получить количественную информацию, количество связанного геля измеряют с помощью самопишущего денситометра. В другом методе гель разрезают поперек на много слоев, каждый из которых анализируют на радиоактивность, измеряют оптическую плотность при соответствующей длине волны или количество красителя. При использовании радиоактивного материала гель можно разрезать вертикально и анализировать методом авторадиографии.

Диск-электрофорез применяют в основном для определения чистоты предположительно чистых белков и для анализа компонентов смесей, когда необходимо получить очень высокое разрешение (т. е. в случае присутствия очень большого числа компонентов).

Понятие чистоты, естественно, относительно, и единственная зона может быть результатом того, что примеси присутствуют в слишком малых количествах, чтобы их можно было определить. Поэтому для проверки чистоты используют большие количества белка. Поскольку предел определения вещества при окрашивании составляет около 1 мкг, для гарантированной 99%-ной чистоты следует наносить 100 мкг белка, причем это количество будет достаточным только в том случае, когда вещество в качестве примеси содержит только один белок! Даже при очень высоких концентрациях (0,5—1,0 мг) наличие одной зоны еще не является критерием чистоты, поскольку примеси могут не отделяться в выбранном буфере или при данном pH. Следовательно, для того чтобы иметь хотя бы некоторую уверенность в гомогенности препарата, обычно необходимо использовать несколько буферов и ряд значений pH.

Следующий пример иллюстрирует использование диск-электрофореза для разделения сложной смеси.

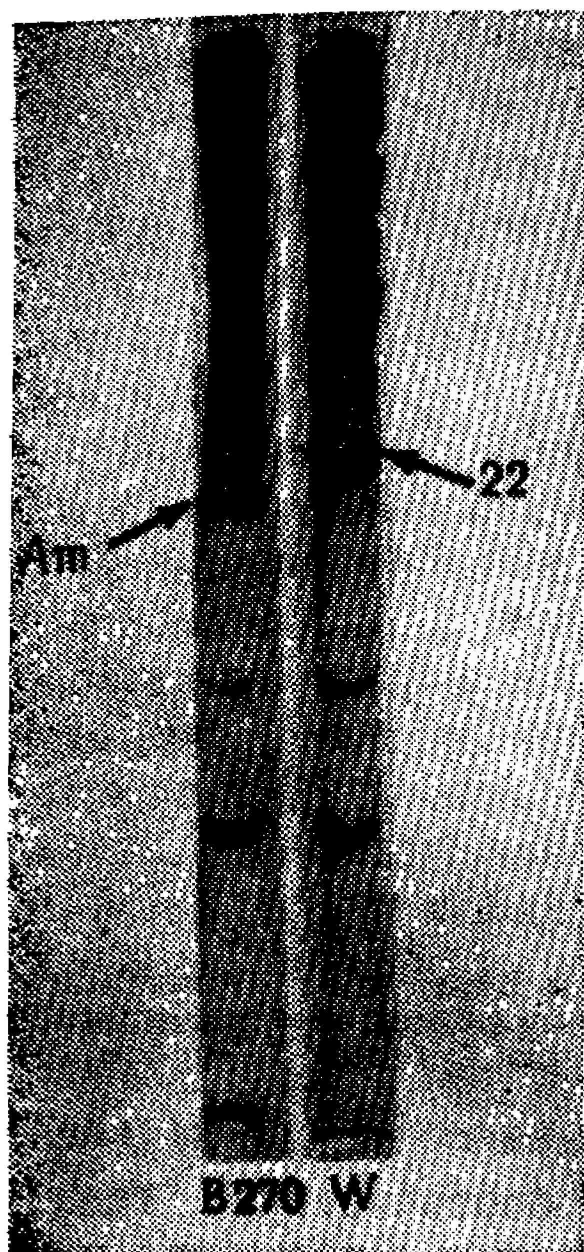


РИС. 9-13.

Электрофореграмма белков, синтезируемых *E. coli* при заражении диким (W) фагом T4 или мутантным (B270) фагом в главном белке головки.

Зараженные клетки метили ^3H-лейцином в течение 10—12 мин после инфекции. Затем белки экстрагировали и подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле, содержащем щелочную мочевину. После электрофореза гель разрезали вертикально и авторадиографировали. Заметим, что зона 22 (главный белок головки) отсутствует в случае терминирующего цепи мутанта B270, а взамен появляется новая зона (Am), соответствующая образующемуся фрагменту [*Hosoda I., Levinthal C.*, Virology, 34, 709—716 (1968)].

Пример 9-А. *Анализ белков, образующихся при заражении бактерии E. coli фагом T4.* Если *E. coli* инфицировать фагом T4, то это приведет к синтезу большого числа белков-медиаторов фага. Относительное количество каждого из них и протекание во времени его синтеза можно изучить с помощью диск-электрофореза, используя для обнаружения белка радиоактивную метку. Если смесь всех белков, содержащихся в инфицированной клетке, подвергнуть электрофорезу и затем окрашиванию, гель окажется окрашенным практически равномерно, поскольку в нем будут присутствовать тысячи белков. Однако инфицирование фагом T4 приводит к прекращению синтеза белков клетки-хозяина, поэтому, если заражение проводить в присутствии ^3H-лейцина, бактериальные белки не будут радиоактивными. Таким образом, для изучения синтеза белков при заражении фагом T4 нужно добавлять ^3H-лейцин через различные промежутки времени после заражения и отделять клетки через несколько минут после каждого добавления ^3H-лейцина. Затем белки выделяют и разделяют с помощью диск-электрофореза, а зоны обнаруживают с помощью авторадиографии. При этом можно заметить, что в разное время образуются различные зоны.

При заражении мутантным фагом, который вызывает синтез только фрагмента изучаемого белка, одна зона исчезает, а вместо нее появляется другая, соответствующая фрагменту (рис.

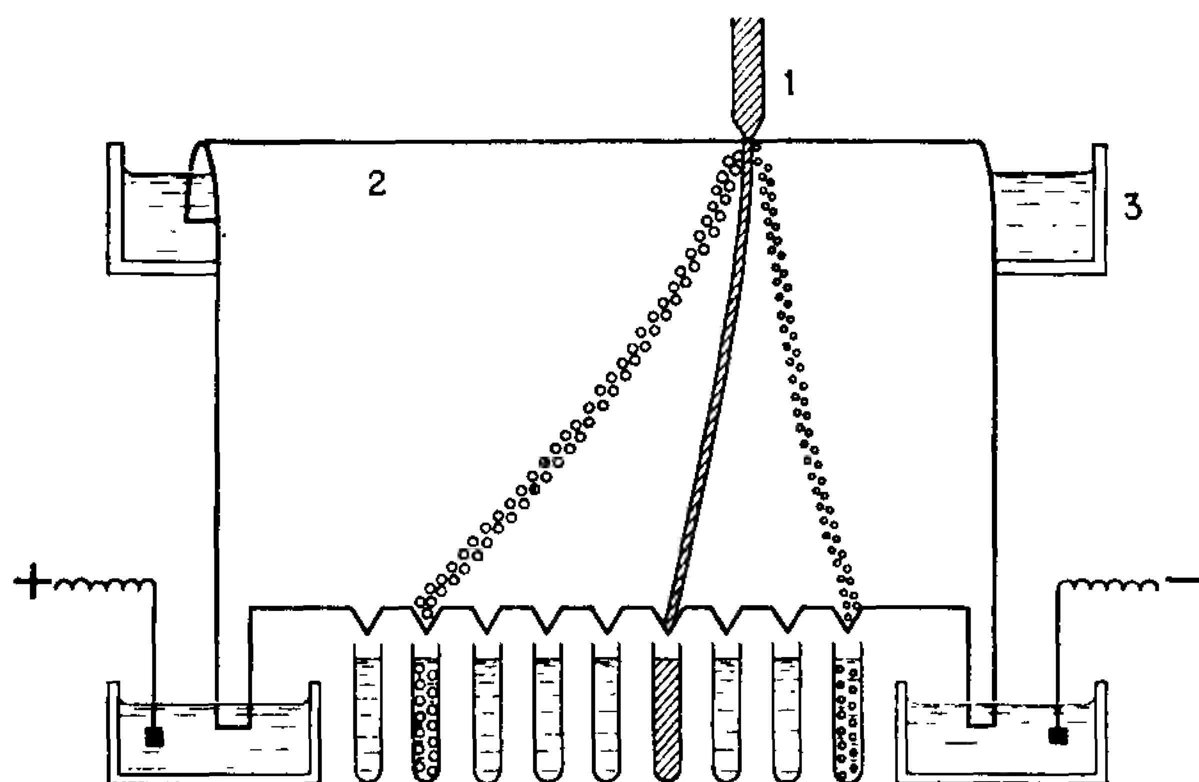


РИС. 9-14.

Прибор для проточного электрофореза.

Образец наносят непрерывно, как показано на схеме, причем буфер течет вертикально вниз по бумаге и капает в пробирки коллектора. Потенциал приложен перпендикулярно направлению тока буфера. *1* — образец; *2* — бумага, пропитанная буфером; *3* — резервуар с буфером.

9-13). Следовательно, исчезающая зона соответствует гену, который претерпел мутацию. При использовании множества таких мутаций можно идентифицировать каждую зону; таким образом определяют последовательность синтеза различных белков. Следует особенно подчеркнуть, что такой анализ проводится в присутствии всех бактериальных белков, однако они не являются помехой, поскольку не включают радиоактивную метку.

Непрерывный (проточный) электрофорез

Непрерывный электрофорез представляет собой препаративный метод, заключающийся в одновременном перемещении непрерывно прибавляемого вещества в одном направлении потоком растворителя и в другом направлении — электрическим полем. В качестве носителя здесь часто используют фильтровальную бумагу, однако можно проводить проточный электрофорез и без целлюлозного носителя. Схема метода показана на рис. 9.14. Большой лист бумаги, расположенный, как показано на рисунке, помещают в камеру из плексигласа. Верхний край бумаги погружают в резервуар с буфером, причем первоначально всю бумагу смачивают буфером. Пока резервуар полон, буфер непрерывно движется по бумаге вниз под действием капиллярных сил и капает с зубцов на нижнем крае в пробирки. Вдоль линии старта непрерывно прибавляется разделяемый раствор с помощью механического шприца или фитиля. Электрическое поле приводит к постоянному горизонтальному перемещению, степень которого зависит от

степени и знака подвижности. Разделение определяется такими факторами, как скорость тока буфера, скорость прибавления вещества, приложенное напряжение, pH и ионный состав буфера; оптимальные условия обычно подбирают опытным путем. Такая система успешно применяется для разделения белков, пептидов, аминокислот, других небольших молекул и неорганических ионов.

При работе с некоторыми веществами приходится сталкиваться с проблемой адсорбции на бумаге. Во избежание этого Курт Хэннинг разработал систему, в которой не требуется целлюлозный носитель. Для этого буфер из резервуара постоянно течет между двумя очень близко расположенными стеклянными пластинами. Точность температурного контроля и малое расстояние между пластинами, обусловливающее значительную капиллярность, понижают конвекцию. Ряд конических отверстий у основания позволяет собирать различные фракции. Этот дорогой и сложный прибор не нашел широкого применения, однако он дает прекрасное разделение белков, пептидов и различных кровяных клеток (например, лимфоциты человека, вырабатывающие антитела, можно отделить от лейкоцитов и макрофагов).

Изоэлектрическая фокусировка

Белки являются амфолитами, т. е. они содержат как положительно, так и отрицательно заряженные группы. Для всех амфолитов характерна зависимость их заряда от pH: при низких pH они заряжены положительно, а при высоких — отрицательно. Для каждого амфолита существует такое значение pH, при котором он является незаряженным; это значение называется *изоэлектрической точкой*. В изоэлектрической точке амфолит не движется в электрическом поле. В градиенте pH молекулы белка будут перемещаться до тех пор, пока не достигнут точки градиента, где они становятся незаряженными; после этого они перестают двигаться. В случае смеси белков каждый белок будет перемещаться до точки градиента pH, соответствующей его собственной изоэлектрической точке. Такой метод разделения белков, основанный на различиях изоэлектрических точек в градиенте pH, называется изоэлектрической фокусировкой и является электрофоретическим аналогом центрифугирования с достижением равновесия в градиенте плотности (гл. 11). Процесс движения двух различных белков с отличающимися изоэлектрическими точками схематически показан на рис. 9-15.

Градиент pH формируется несколько необычным способом. Если создавать его просто диффузией одного буфера в другой при различных значениях pH или смешивать два буфера по мето-

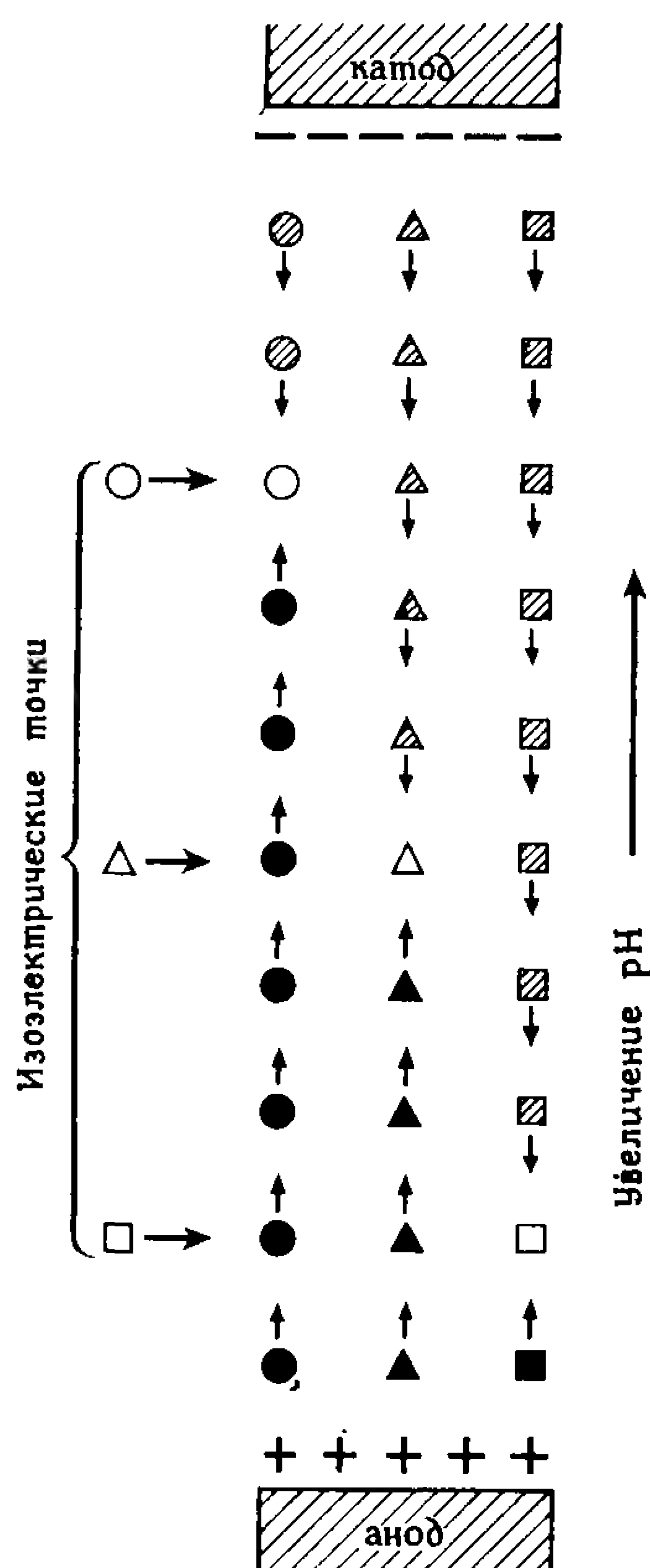


РИС. 9-15.

Процесс миграции при изоэлектрической фокусировке.

Белки движутся до тех пор, пока они не достигнут такого положения в градиенте pH, когда они перестают быть заряженными.

ду, используемому для получения градиентов концентрации (гл. 8), образующийся градиент не будет стабильным в электрическом поле; ионы градиента будут мигрировать в поле, поэтому фракционирование происходить не будет, так как макромолекулы будут двигаться медленнее, чем градиент будет разрушаться. Метод создания стабильного градиента pH состоит в использовании синтетических низкомолекулярных (молекулярная масса 300—600) полиамфолитов (многозарядных структур), перекрывающих широкий диапазон изоэлектрических точек. Эти полиамфолиты обычно представляют собой смешанные полимеры алифатических амино- и карбоновых кислот (например, амфолин, LKB Industries, Inc.) Сначала градиент pH устанавливается в дистиллированной воде, где диапазон перекрывания изоэлектрических точек невелик. Перед приложением электрического поля pH во всей системе один и тот же и представляет среднее значение для всех амфолитов в растворе. При приложении поля начинается движение полиамфолитов. Вследствие их собственных буферных

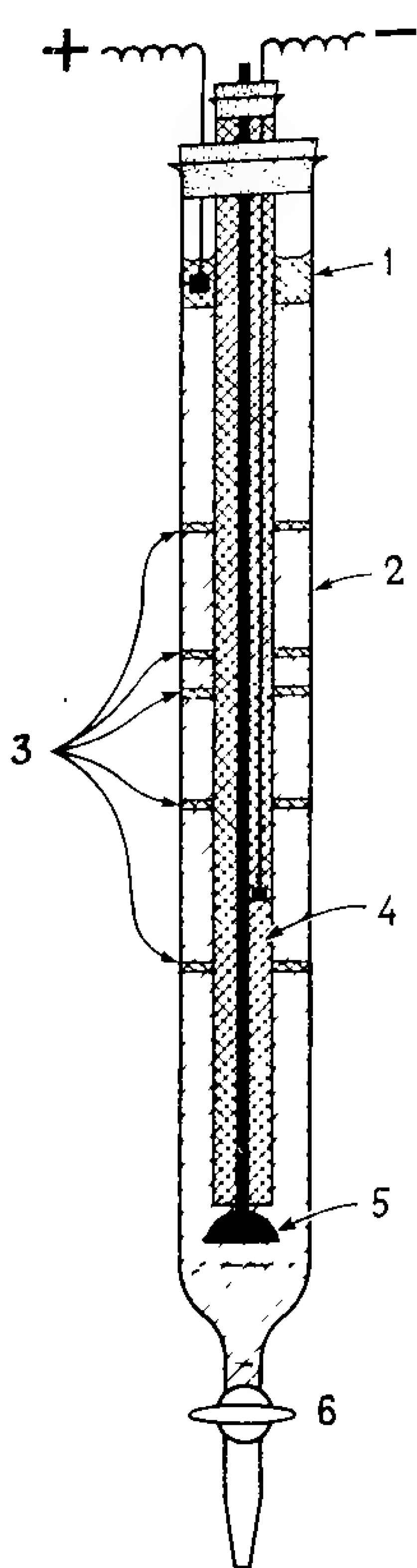


РИС. 9-16.

Устройство для изоэлектрической фокусировки.

Описание его действия приведено в тексте. *1* — фосфорная кислота; *2* — градиенты pH и плотности (амфолит-носитель + сахароза); *3* — электрофокусированные белки; *4* — триэтаноламин; *5* — клапан; *6* — сливной кран.

емкостей постепенно устанавливается градиент pH. После этого каждая частица будет останавливаться в таком самоустанавливающемся градиенте в точке, соответствующей ее собственной изоэлектрической точке. Если в смеси содержатся белки с различными изоэлектрическими точками, они будут двигаться до положений, соответствующих их изоэлектрическим точкам до тех пор, пока концентрация и буферная емкость белка (который также является полиамфолитом) не превышают значений, нарушающих градиент pH.

Для этой цели используется устройство, изображенное на рис. 9-16. Градиент pH создается в колонке, охлаждаемой водой, которая изготовлена из стекла и содержит катодную трубку и анод. Колонка заполнена полиамфолитом одной концентрации в градиенте концентрации сахарозы для предотвращения конвекции. Образец также готовится в виде суспензии в полиамфолите. Катодная трубка заполнена сильным основанием (обычно триэтаноламином), а в верх колонки залита фосфорная кислота, в

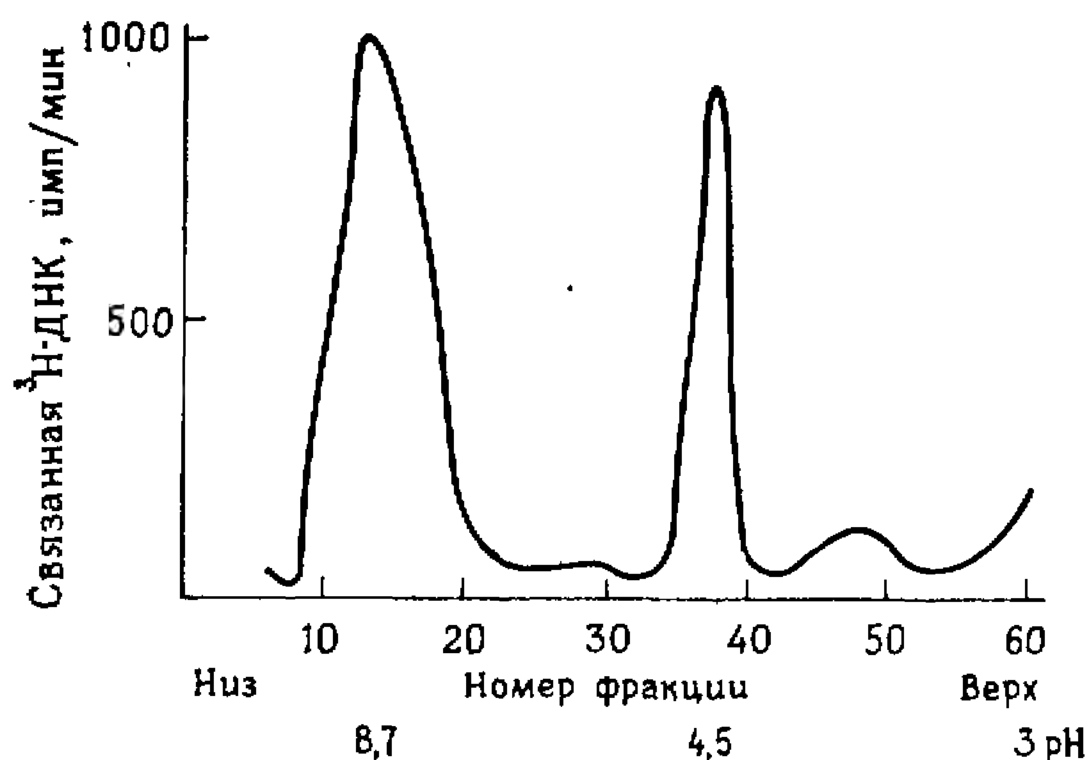


РИС. 9-17.

Изоэлектрическая фокусировка.

Фермент «УФ-эндо» с помощью различных хроматографических процедур был очищен до несомненной гомогенности. Однако при проверке его методом изоэлектрической фокусировки оказалось, что он состоит из двух белков, каждый из которых обладает ферментативной активностью. Активность фермента определяли по его способности связывать облученную ультрафиолетовыми лучами ^{3}H-ДНК с нитроцеллюлозой в мембранном фильтре. Обратите внимание, что градиент pH нелинеен. (Любезно предоставил Шейх Риазуддин.)

слое которой находится анод. Клапан на дне катодной трубки открывают, после чего к электродам прикладывают напряжение в несколько сот вольт. Полиамфолит вблизи катода будет иметь отрицательный заряд и двигаться по направлению к катоду. Через 1—3 дня система придет в равновесие и белки распределятся в градиенте pH в соответствии с их изоэлектрическими точками. Затем колонку сушат и фракционируют через сливной кран на дне. Различные белки определяются спектрофотометрически, по ферментативной активности или по радиоактивности. Изоэлектрическая фокусировка может применяться как в аналитическом, так и в препаративном вариантах. На рис. 9.17 показана обычно получаемая картина разделения. Метод изоэлектрической фокусировки имеет два больших преимущества: 1) возможно разделение, которое нельзя осуществить другими методами, и 2) белки значительно концентрируются.

Препаративный электрофорез в больших масштабах

Блок-электрофорез

Суспензию гранул крахмала (или стеклянного порошка, силикагеля, целлюлозы, поливинилхлорида или агара) в буфере выливают в большой прямоугольный сосуд, в каждый конец которого вмонтированы электроды. Образец вводят в желобок, получаемый при удалении крахмала вблизи одного из электродов, смешивают раствор белка с крахмалом и закрывают желобок. После электрофореза блок вынимают и элюируют каждую секцию.

Электрофорез на колонках с полиакриламидом

Для этой процедуры применяется аппарат, показанный на рис. 9—18. Вещество постоянно стекает в элюирующий буфер, который проходит через колонку, как показано на рисунке. Элюирующий буфер собирают с помощью коллектора фракций.

Иммуноэлектрофорез

Как отмечалось выше в этой главе, вещества с одинаковой подвижностью часто можно разделить с помощью последующей хроматографии в перпендикулярном направлении или хроматографией с последующим электрофорезом (рис. 9-3). Такое разделение включает две стадии. Иммуноэлектрофорез также состоит из двух стадий: вещества сначала разделяются методом электрофореза, а затем обнаруживаются с помощью иммунодиффузии (гл. 10).

Иммуноэлектрофорез обычно проводят на горизонтальных пластинках агара или агарозы, как показано на рис. 9-19. Для этого готовят однородный слой и в нем делают ямку и желобок, в которые помещают антиген и антитело соответственно. Смесь антигенов помещают в ямку, после чего пластинку подвергают электрофорезу, во время которого молекулы движутся в обоих направлениях, причем проходимые расстояния зависят от их подвижностей и знака заряда. После окончания электрофореза в желобок вносят антисыворотку. Антисыворотка и антигены диффундируют через гель. Если при их встрече происходит реакция антиген — антитело, образуется видимая искривленная преципитиновая линия (рис. 9-19, *B* и гл. 10). Этот метод позволяет идентифицировать ряд антигенов, вызывающих образование антител, и относительное количество каждого, причем возможно

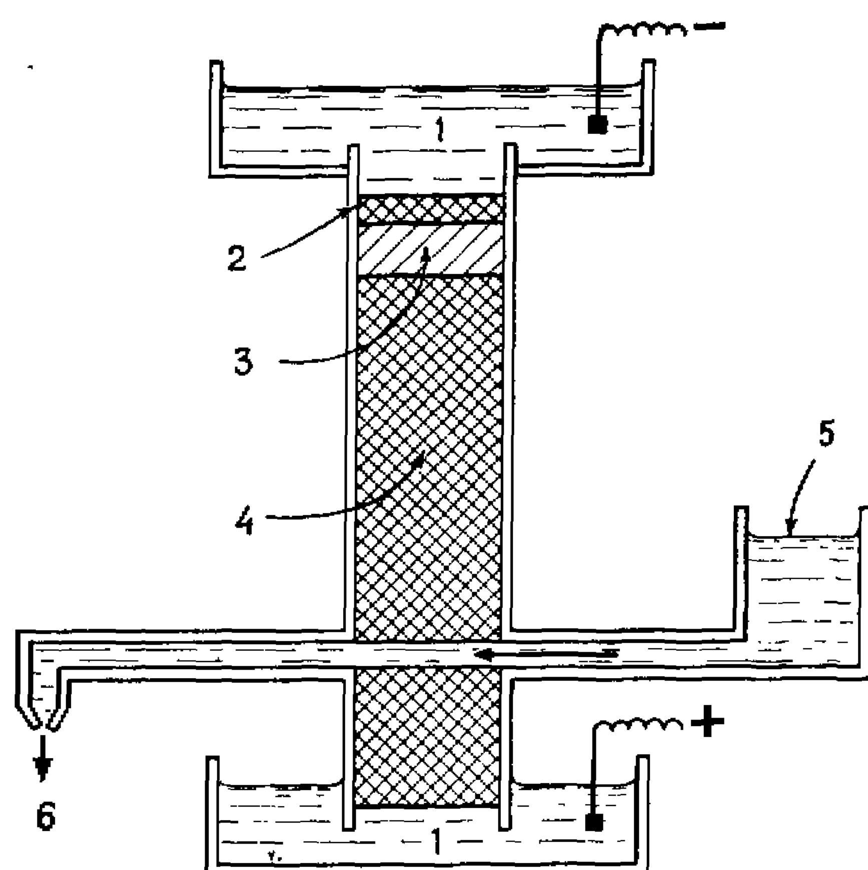


РИС. **9-18.**

Прибор для препаративного диск-электрофореза для разделения больших количеств. Для сравнения см. рис. 9-12.

1 — буфер; *2* — образец; *3* — гель-прокладка; *4* — разделяющий гель; *5* — элюирующий буфер; *6* — к коллектору фракций.

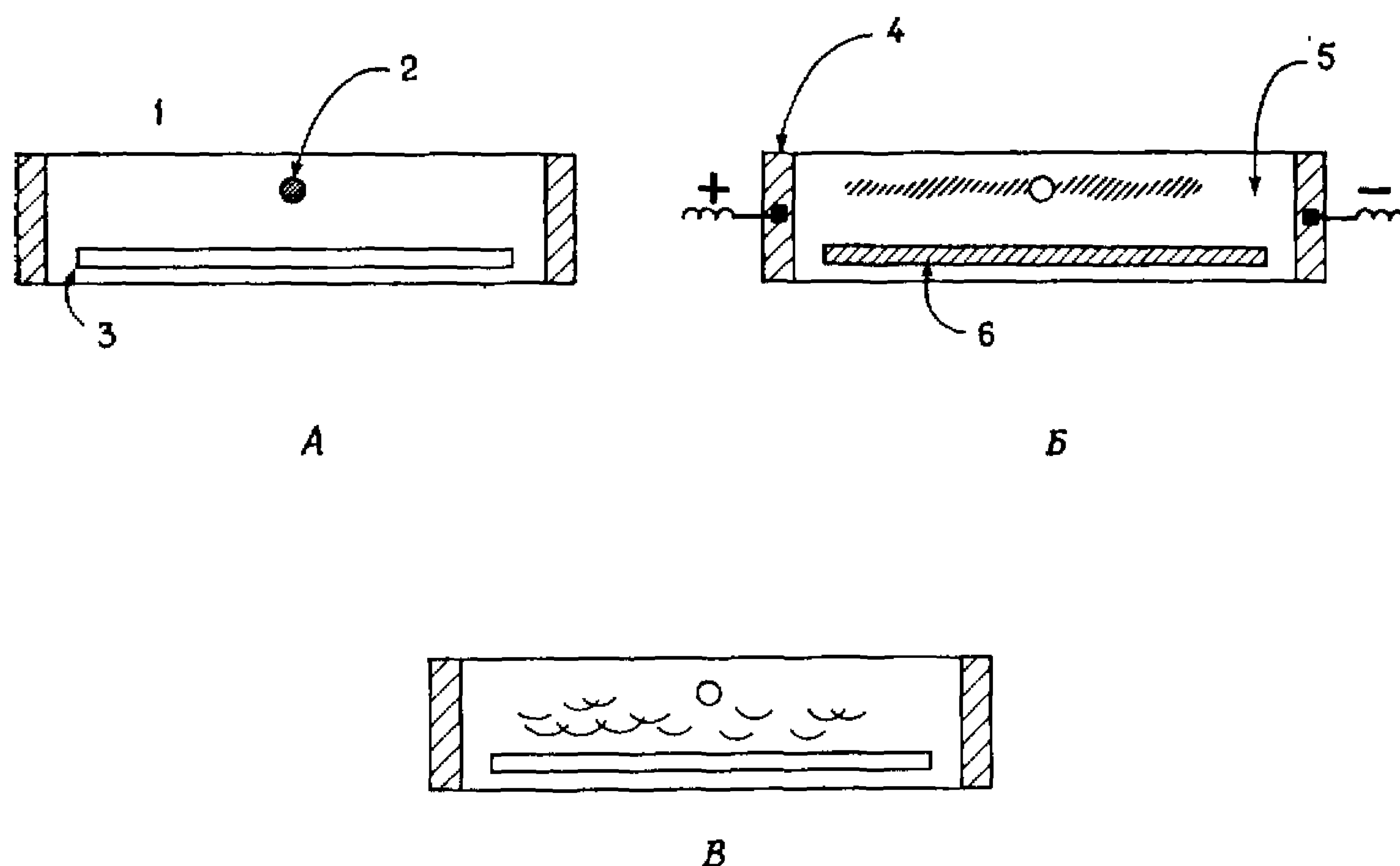


РИС. **9-19.**

Проведение иммуноэлектрофореза.

А — лунка заполняется белком; *Б* — электрофорез приводит к движению белков. Затем ток отключают и в желобок добавляют антисыворотку; *В* — иммунодиффузия приводит к образованию преципитиновых линий. *1* — предметное стекло микроскопа; *2* — лунка, заполненная антигеном; *3* — желобок для смеси антител; *4* — полоска фильтровальной бумаги, насыщенная буфером; *5* — агаровый гель; *6* — антисыворотка.

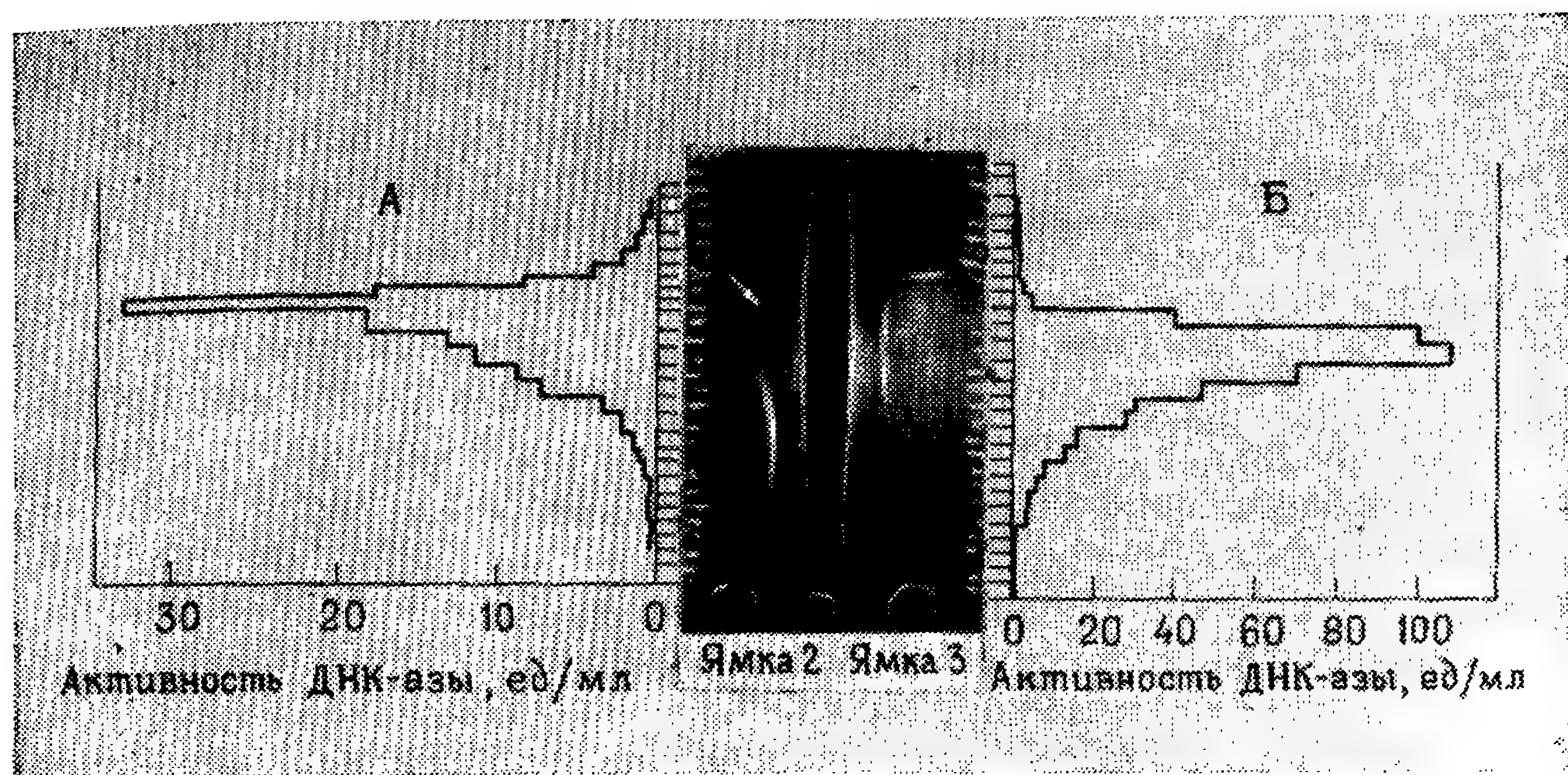


РИС. 9-20.

Использование иммуноэлектрофореза для анализа чистоты экзонуклеазы фага λ *E. coli*.

Относительно очищенная фракция λ экзонуклеазы (А) и более тщательно очищенная фракция (Б) анализировались следующим образом. Делали четыре ямки и заполняли их белком: две слева — фракцией А, а две справа — фракцией Б. Систему подвергали электрофорезу таким образом, что движение происходило вверх в плоскости рисунка. Внешние полоски, соответствующие ямкам *1* и *4*, разрезали перпендикулярно направлению движения. Каждый срез элюировали и анализировали на эндонуклеазную активность. На графиках показана активность в срезах как функция положения. Центральный желобок был заполнен антисывороткой, направленной против частично очищенной эндонуклеазы, после чего проводили иммунодиффузию (гл. 10). Заметим, что во фракции А главная преципитиновая зона не совпадает по положению с активностью; в этом месте находится только очень слабая полоса (указана стрелкой). Следовательно, в ферменте имеется основная примесь. Во фракции Б более тщательная очистка приводит к исчезновению зоны примеси и видна только одна полоса в надлежащем месте. Следовательно, этот белок является чистым [*Radding C. M., Shreffler D. C.*, J. Mol. Biol., **18**, 251—261 (1966)].

анализировать материал, для которого пригоден только метод иммунологического анализа (например, перекрестно-реагирующие неактивные фрагменты ферментов) (рис. 9-20).

Список литературы

DeWachter R., Fiers W., Fractionation of RNA by Electrophoresis on Polyacrylamide Gel Slabs, in "Methods in Enzymology", vol. 21, edited by L. Grossman and K. Moldave, Academic Press, 1971, pp. 167—178.

Efron M., High Voltage Paper Electrophoresis, in "Cromatographic and Electrophoretic Techniques", vol. 2, edited by I. Smith, Interscience, 1960, pp. 158—189.

Gordon A. H., Electrophoresis of Proteins in Polyacrylamide and Starch Gels, in "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", vol. 1, edited by T. S. Work and E. Work, North-Holland, 1968, pp. 1—149.

Maurer H. R., Disc Electrophoresis, deGruyter, 1971.

Ornstein L., Disc Electrophoresis, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 321—349 (1964).

Raymond S., Acrylamide Gel Electrophoresis, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 350—365 (1964).

Smithies O., Zone Electrophoresis in Starch Gels: Group Variations in the Serum Proteins of Normal Human Adults, Biochem. J., **61**, 629—641 (1953). Первое описание использования гелей крахмала.

Weber K., Ocborn M., The Reliability of Molecular Weight Determined by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, J. Biol. Chem., **244**, 4406—4412 (1969). В статье изложены основные принципы ДСН-гель-электрофореза.

Zwaan J., Estimation of Molecular Weights by Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Analyt. Biochem., **21**, 155—168 (1967).

Zweig G., Whitaker J. R., Paper Chromatography and Electrophoresis, vol. 1; Electrophoresis in Stabilizing Media, Academic Press, 1967.

Задачи

9-1. Почему электрофорез проводят в растворах с низкой концентрацией солей?

9-2. Имеет ли значение в двумерной хроматографии и электрофорезе, какая операция выполняется в первую очередь?

9-3. Какие параметры (например, pH, ионная сила, температура и т. д.) требуется варьировать при определении условий максимального разделения двух компонентов? Какое влияние будет оказывать на разделение изменение каждого из них?

9-4. Смесь белков подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле при трех различных значениях pH. В каждом случае можно было видеть пять зон. Можно ли с достаточным основанием утверждать, что в смеси присутствует только пять белков? Объясните.

9-5. Фермент был тщательно очищен. Ряд критериев свидетельствовал о его чистоте — он давал один пик при хроматографии, электрофорезе или центрифугировании в различных условиях. При анализе методом ДСН-электрофореза получилось две зоны, причем площадь одной была в 2 раза больше, чем другой. Какую информацию о белке можно получить из этого факта? Поскольку чистоту всегда трудно удостоверить, считаете ли вы, что предположение было правильным? (Что может дать в этом случае гель-проникающая хроматография?)

9-6. Вирус содержит 256 белков, 64 из которых имеют молекулярную массу 1800, а 192 — 26 000. Если вирус разрушить и проанализировать методом ДСН-гель-электрофореза, каковы будут относительные расстояния миграции и относительные площади зон?

9-7. Предположим, что вы выделили белок, обладающий двумя ферментативными активностями. Исходя из этого, вы предполагаете, что при очистке получилось два белка. Для проверки этого вы подвергли препарат электрофорезу в полиакриламидном геле при различных значениях pH. В каждом случае получалась единственная зона, однако более широкая, чем обычно, поэтому вы предположили, что она в действительности представляет собой две неразрешенные зоны. В ДСН-геле также получается одна широкая зона. Поскольку белки с двумя ферментативными активностями встречаются редко, следует внимательнее посмотреть, не является ли большая ширина зоны результатом наложения двух зон. Какие параметры вы можете варьировать для улучшения разрешения электрофореза? Какие другие неэлектрофоретические методы могли бы здесь помочь?

ГЛАВА 10

Иммунологические методы

Идентификацию и анализ биологического материала чаще всего проводят с применением химических тестов, спектроскопических методов и определения различных физических параметров, например коэффициентов седиментации, электрофоретических подвижностей и т. д. Для анализа очень маленьких количеств традиционные химические методы оказываются непригодными; в этих случаях используют технику радиоактивных меток, описанную в гл. 5. К сожалению, при анализе сложных систем, таких, как клетки в культуре, а иногда и целые животные или растения, не всегда оказывается возможным вводить достаточное количество радиоактивного материала, чтобы пометить необходимое для анализа количество конкретного вещества — либо из-за разбавления, либо вследствие опасности для организма.

Иммунологические методы позволяют преодолеть эти трудности, поскольку они дают возможность анализировать минимальные количества нерадиоактивного материала в сложных смесях.

Иммунологическая система

В ответ на введение чужеродного вещества животному в его организме вырабатывается *антитело* (Ат), которое способно реагировать с введенным веществом. Антитела представляют собой белки, находящиеся в крови, и являются представителями класса сывороточных белков, называемыми *иммуноглобулинами*. Любое вещество, вызывающее образование антитела, называется *антигеном* (Аг). Антитело, образующееся при воздействии антигена, обладает важным свойством специфически реагировать с антигеном, который стимулирует его образование, но не с большинством других антигенов. Аналогичным образом антиген не способен реагировать с любым другим антителом кроме того, образование которого он вызывает.

Гаптен представляет собой вещество, которое само не может инициировать синтез антитела, но способно реагировать со специфическим к гаптену антителом. Большинство гаптенов представляют собой молекулы с низкой молекулярной массой (<1000); антитела к гаптенам обычно получают путем химического связывания гаптена (с помощью ковалентной связи) с иммуногенным веществом, таким, как сывороточный альбумин, и

введением получаемого конъюгата животному (например, кролику). Антитело, полученное против вещества X (где X может быть как антигеном, так и гаптеном), обычно называется *анти*-X. Комплекс антиген — антитело часто обозначают Аг — Ат.

Помимо иммуногена имеются и другие вещества, которые реагируют со специфическим антителом, хотя обычно с меньшей эффективностью. Такие реакции носят название *перекрестных*. Один из видов перекрестных реакций существует тогда, когда антиген А частично реагирует с анти-Б, а антиген Б частично реагирует с анти-А. Кроме того, существуют и асимметричные перекрестные реакции, когда антиген А реагирует с анти-Б, однако антиген Б не реагирует с анти-А.

Антитела, будучи белками, проявляют антигенные свойства в организмах других животных. Например, антитело, полученное из кроличьей сыворотки, при введении козе вызывает образование антитела. Антитело козы не реагирует с антигеном, который вызвал образование антитела кролика, однако реагирует с антителом кролика; его обычно называют *антителом козы против антитела кролика*.

Если биологическая активность вещества нарушается при воздействии антитела, то говорят о *нейтрализации* вещества.

Получение антител

Так как антитела вырабатываются в крови животных в ответ на введение инородного вещества, их можно получать из крови животных, которым несколько раз вводили один и тот же антиген или гаптен в виде конъюгата. Вследствие специфичности реакции Аг — Ат обычно нет необходимости выделять специфическое антитело или даже фракцию иммуноглобулинов. Таким образом, в большинстве иммунологических операций используется сыворотка крови, из которой все клетки удалены центрифугированием. Сыворотка, содержащая определенное антитело, называется *антисывороткой*. Существуют случаи, когда антисыворотку требуется подвергать частичной очистке. Например, если гаптен, связанный с сывороточным альбумином, вводить животному с целью получения антигаптена, в организме животного одновременно образуется антиальбумин сыворотки. Если получать антитело к УФ-облученной ДНК, то образуется также антитело, активное только против необлученной ДНК. Антитело к носителю может оказаться неприемлемым в данном эксперименте, и в таких случаях его необходимо удалить. Этот осуществляется с помощью *адсорбции:* к сыворотке добавляют антиген к нежелательному антителу, в результате чего образуется комплекс антиген — антитело. В определенных условиях этот комплекс можно

отделить центрифугированием. Повторное добавление антигена обычно приводит к полному удалению нежелательного антитела. Иногда бывает необходимо получить чистое антитело; оно может быть получено с помощью аффинной хроматографии (гл. 8).

Получение антигаптена требует специальных методов. Поскольку сам гаптен не иммуногенен, его связывают с сильно иммуногенными молекулами, такими, как альбумин бычьей сыворотки или некоторые синтетические полипептиды, и после этого вводят кролику. Связывание иногда вызывает трудности, поскольку гаптен должен содержать как минимум одну функциональную группу, которую можно использовать для связывания с доступной функциональной группой (например, амино, карбоксильной, фенольной, имидазолильной, сульфгидрильной, индолильной и гуанидино) белка в условиях, которые не приводили бы к разрушению как гаптена, так и белка. Другими словами, требуется получить химическое производное гаптена, с помощью которого можно осуществить связывание. В табл. 10-1 перечислены гаптены, к которым получены антитела. Возможность получения антител крайне важна для проведения радиоиммунологического анализа, что будет описано в дальнейшем.

ТАБЛИЦА 10-1

Различные гаптены, к которым могут быть получены антитела[a]

Пептидные гормоны	Инсектициды
Непептидные гормоны	Углеводы (например, глюкоза, мальтоза, лактоза)
Коферменты	Катехоламины
Витамины	Липиды
Лекарственные вещества	Стероиды
Токсины	Компоненты нуклеиновых кислот
Канцерогены	Растительные гормоны

[a] Полное описание см.: *Butler V. P., Beiser S. M.*, Advan. Immunol., **17**, 255—31 (1973).

Реакция антигена с антителом

После получения антитела проводят реакцию антиген — антитело путем смешивания этих двух веществ в буфере и инкубирования до тех пор, пока реакция не пройдет полностью. Буфер обычно обладает нейтральным pH и является изотоническим для предотвращения денатурации белкового антитела, хотя допускается колебание значений pH в пределах ±2 единицы, а для ионной силы возможен фактор 2.

Реакцию легко заметить, хотя она обычно проходит в сложных смесях, содержащих другие белки, небольшие молекулы, полисахариды, липиды и т. д., которые, как правило, не влияют на скорость и течение реакции. При количественных опытах обычно проводят контрольный эксперимент, чтобы убедиться в отсутствии в смеси мешающих веществ, так как в некоторых случаях реакционные смеси содержат вещества, которые разрушают либо антиген, либо антитело.

Иммунные реакции, используемые в биологическом анализе

Реакция преципитации

В определенных условиях прибавление антитела к раствору, содержащему антиген, приводит к образованию комплекса и преципитации. Количество антитела, преципитируемого различными количествами антигена, зависит от соотношения антиген — антитело и описывается *кривой преципитации* (рис. 10-1). Преципитин отвечает определенному типу *обратимо диссоциирующего* комплекса антиген — антитело. Обратимость следует из того

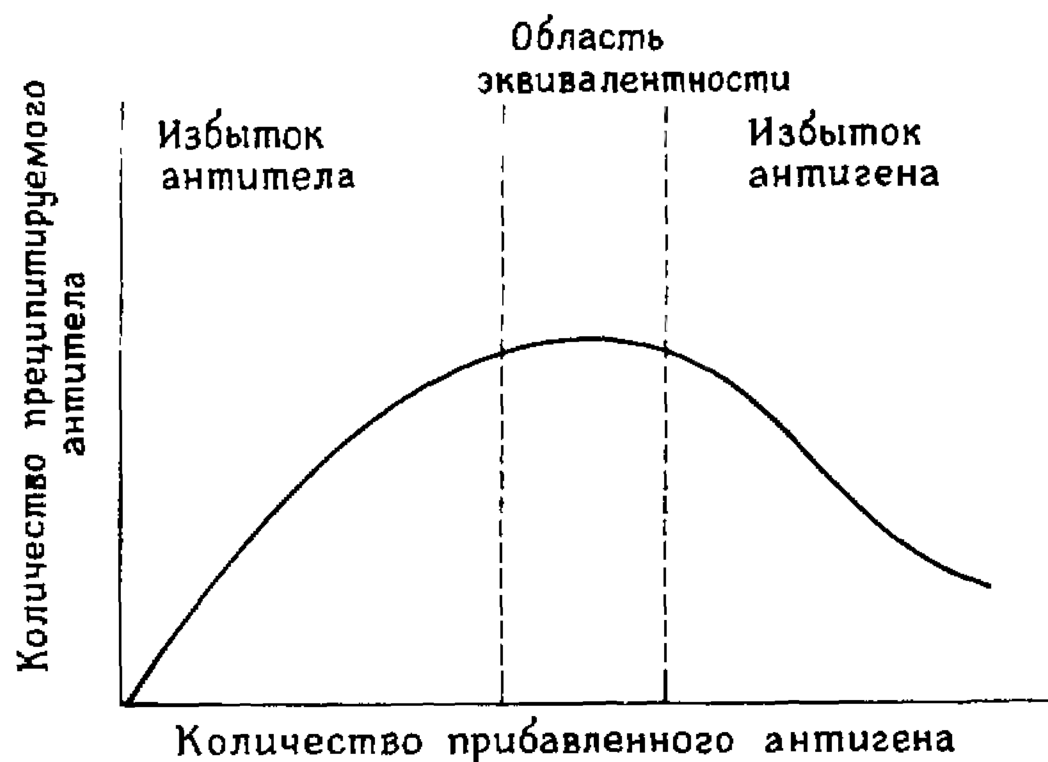


РИС. 10-1.

Кривая преципитации.

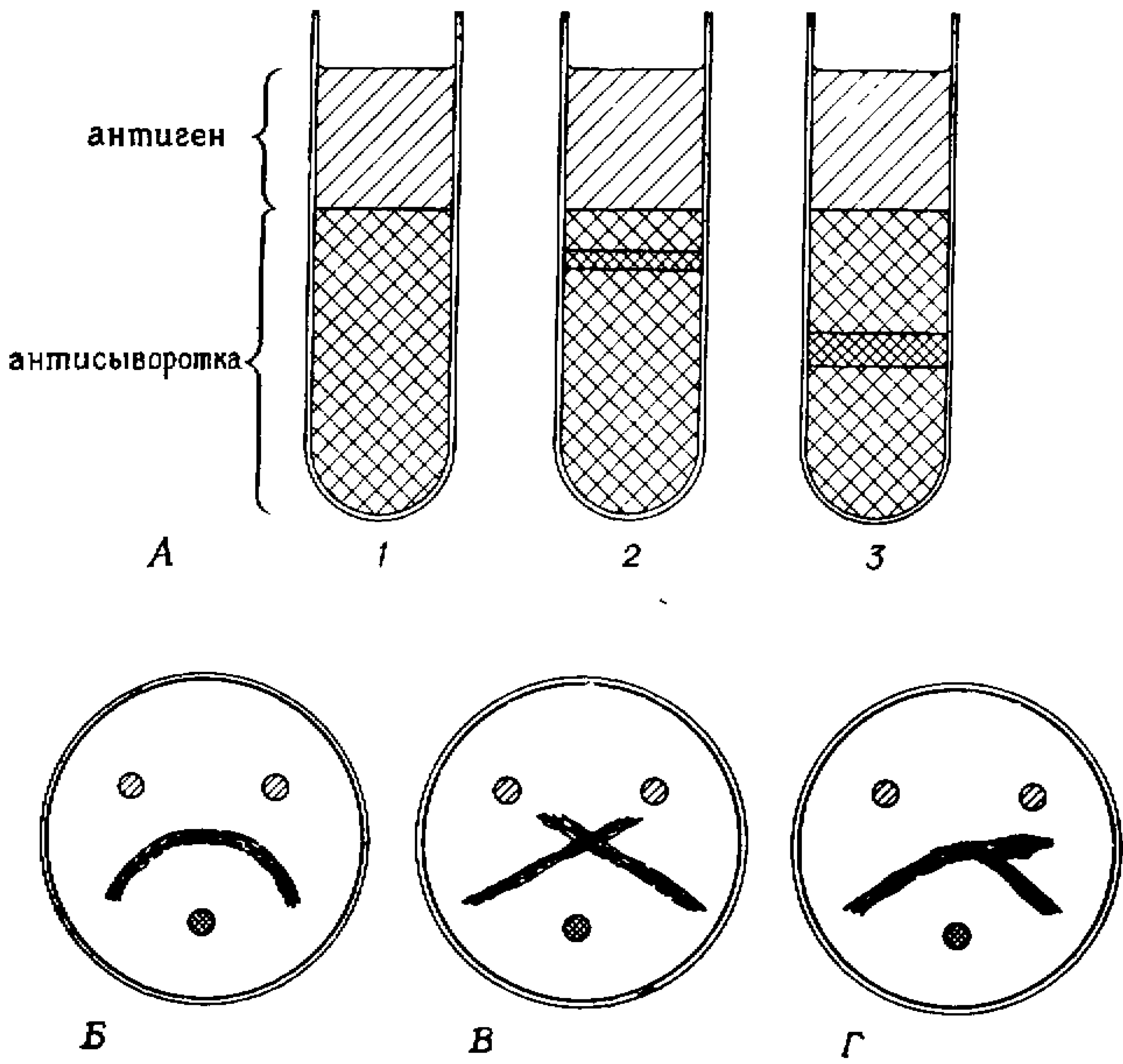
Различные количества антигена прибавляют к постоянному количеству антитела. После необходимой инкубации смесь центрифугируют и определяют количество преципитированного антитела путем измерения количества антитела, оставшегося в супернатанте. В области избытка антитела преципитируется весь антиген, т. е. супернатант содержит избыток антитела. В области избытка антигена бóльшая часть антитела не образует преципитата, поэтому супернатант содержит смесь антигена и антитела. При эквивалентности преципитируются полностью и антиген и антитело.

факта, что даже после образования преципитина его количество зависит от изменения соотношения антиген — антитело. В условиях *избытка антитела* и *эквивалентности* антиген преципитируется полностью; таким образом, преципитация избытком антитела может быть использована для удаления из раствора некоторых веществ. Например, для определения количества конкретного белка (назовем его А) к смеси радиоактивных белков можно прибавить анти-А и отделить преципитат центрифугированием. Соотношение общей и осаждаемой радиоактивности дает возможность установить количество белка А в смеси белков. О значении реакции преципитации в радиоиммунологическом анализе речь пойдет ниже.

Гель-диффузионные реакции преципитации и иммунодиффузия

Реакция преципитации может проводиться в агаровом геле. Схематически этот метод изображен на рис. 10-2, *А*. Пробирку частично заполняют агаром, содержащим антисыворотку, а сверху наносят антиген. Антиген диффундирует в агар с образованием движущегося фронта образования преципитата. В данном случае преципитат представляет собой зону вследствие обратимости реакции преципитации, о чем упоминалось в предыдущем разделе. Таким образом, в верхней части пробирки из-за избытка антигена наблюдается небольшое количество преципитина (рис. 10-1). При продолжающейся диффузии антигена зона преципитата перемещается. Это происходит потому, что в передней части зоны преимущественно содержится антитело, тогда как в задней имеется избыток антигена; избыток антигена растворяет преципитат (рис. 10-1). Если и антиген, и антитело представляют собой смеси некоторых реагирующих веществ, то в результате будет наблюдаться несколько зон, предположительно по одной на каждый комплекс антиген — антитело. Разделение этих зон зависит от коэффициентов диффузии антигенов и относительных концентраций антигенов и антител; таким образом, если два антигена имеют однаковые коэффициенты диффузии, а концентрации антигенов и антител также одинаковы, то в результате будет наблюдаться только одна зона. Число наблюдаемых зон всегда представляет минимальное значение числа присутствующих антигенов.

Дополнительная информация может быть получена с помощью *метода двойной диффузии (метод Ухтерлони)*, схематически изображенного на рис. 10-2, *Б—Г*. В агаровом геле, находящемся в чашке Петри, делают три лунки, две из которых заполняют антигеном, а третью — антисывороткой. Из каждой лунки по всем направлениям происходит диффузия. При достижении


антиген
антисыворотка
А
1
2
3
Б
В
Г

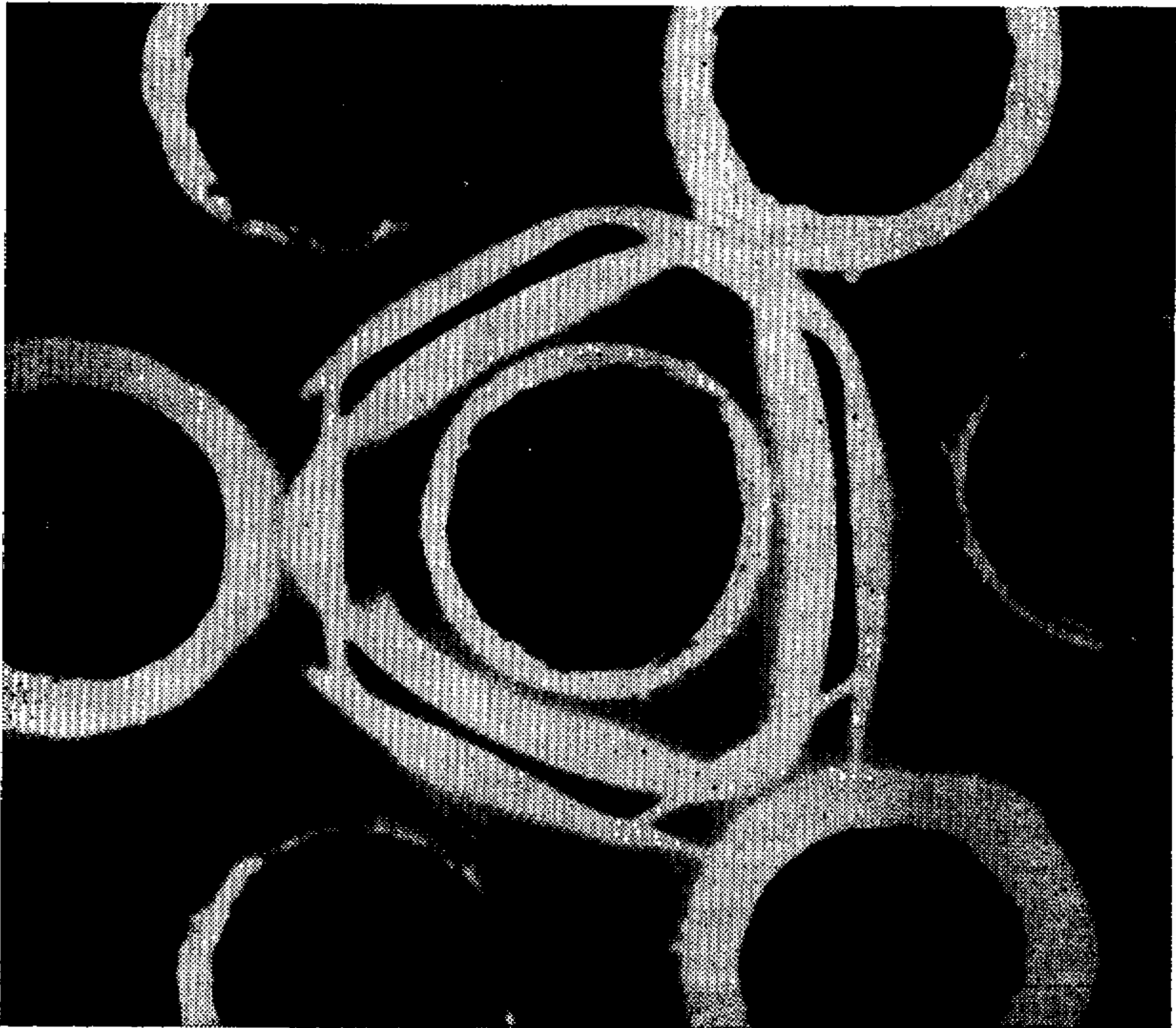


РИС. 10-2.

Гель-диффузионная реакция преципитации.

А — одномерная диффузия (метод Удена). Пробирку частично заполняют агаром, содержащим антисыворотку. После затвердевания агара его покрывают сверху слоем агара, содержащего антиген, который также затвердевает. Далее антиген диффундирует в антисыворотку. *Б—Г* — двойная диффузия в двух направлениях (метод Ухтерлони). Чашку Петри заполняют гелем агара, в котором делают три цилиндрические лунки. Одну из них заполняют антисывороткой (темный кружок), а две другие — антигеном. В части *Б* обе верхние лунки заполнены одним и тем же антигеном. В части *В* верхние лунки заполнены разными антигенами, а нижняя содержит антитела к обоим антигенам. В части *Г* в нижней лунке находится антитело к одному из антигенов; слева в верхней лунке находится антиген, а справа — перекрестно-реагирующий антиген. *Д* — фотография пластинки, полученной по методу Ухтерлони. Рассмотрим только внешние зоны, так как внутренняя полоса соответствует примеси белкового происхождения. Лунки *a*, *c* и *e* содержат экзонуклеазу фага λ *E. coli*. Лунка *b* содержит иммунологически неотличимый белок, так как полосы здесь сплошные. Лунки *d* и *f* содержат отличающиеся экзонуклеазы, вступающие в перекрестные реакции (обратите внимание на шпоры) [*Radding C. M.*, Methods Enzymol., 21, 458—462 (1971)]. *1* — $t=0$; *2* — через некоторое время; *3* — через большой промежуток времени.

точки эквивалентности между лунками антитела и антигена появляется преципитиновая линия. Если две лунки антигена содержат один и тот же антиген, получается кривая, показанная на рис. 10-2, *Б*. Если антигены различны, появляются две независимые линии, которые пересекаются, как показано на рис. 10-2,*В*. Если между двумя антигенами имеется перекрестная реакция, то наблюдается картина, изображенная на рис. 10-2, *Г*. Небольшая область сбоку от кривой на рис. 10-2, *Г* называется *шпорой* и почти всегда указывает на менее активный антиген. Два различных слабо реагирующих антигена, вступающих при этом в перекрестную реакцию, дают пересекающиеся полосы, как на рис. 10-2, *В*, поэтому их можно спутать с независимыми веществами. Однако перекрест представляет собой шпоры только в случае их меньшей плотности по сравнению с основной линией и когда они имеют ярко выраженную кривизну. Метод Ухтерлони можно использовать для идентификации неизвестного вещества путем сравнения с известным, так как в случае их идентичности наблюдается картина, показанная на рис. 10-2, *Б*.

Фиксация комплемента

Сыворотка крови содержит целый класс белков, не являющихся иммуноглобулинами и носящих название *комплемента* или К′. Комплемент не реагирует с антигеном или антителом по отдельности, однако взаимодействует с разнообразными комплексами антиген — антитело. По неясным пока причинам комплемент не реагирует с комплексами гаптен — антитело. Поэтому для определения гаптенов обычно используют метод торможения (см. следующий раздел).

Анализ по фиксации комплемента основан на свойстве комплемента связываться комплексом антиген — антитело, в резуль-

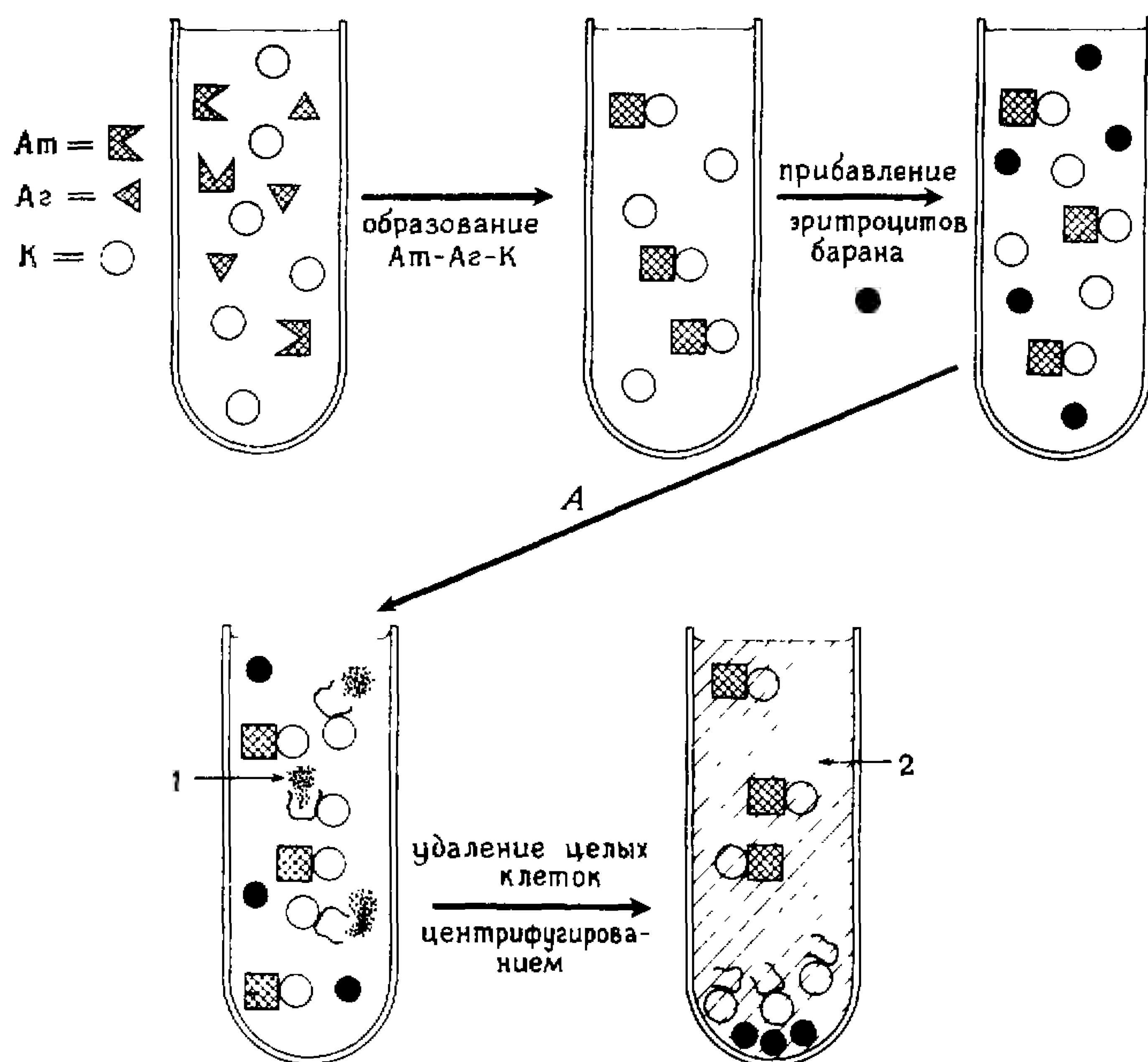


РИС. 10-3.

Фиксация комплемента.

Для наглядности здесь приведены эквивалентные количества антитела и антигена и избыток комплемента. Обычно количества антигена и антитела выбирают так, чтобы комплемент связывался при эквивалентности. Эритроциты барана предварительно покрываются антителами кролика к эритроцитам барана; на рисунке это опущено. *А* — свободный комплекс связывается с эритроцитами, подвергая их лизису. *1* — выделившийся гемоглобин; *2* — гемоглобин в супернатанте определяется измерением оптического поглощения.

тате чего остается меньшее количество комплемента. При наличии антигена к некоторым элементам поверхности эритроцитов добавление комплемента приводит к *лизису* (разрыв клеток). В случае эритроцитов лизис хорошо виден: если интактные (целые) клетки центрифугировать, красный пигмент гемоглобин оказывается на дне центрифужной пробирки; при наличии лизиса (в данном случае гемолиза) гемоглобин остается в супернатанте, причем его количество можно определить по поглощению при 541 нм (гл. 14). В стандартном тесте используется сыворотка морской свинки в качестве источника комплемента, эритроциты барана и антитела кролика к эритроцитам барана. Анализ обычно проводится в две стадии (рис. 10-3):

1. Антиген, антитело и измеренное количество комплемента смешивают и инкубируют до полного связывания комплемента.

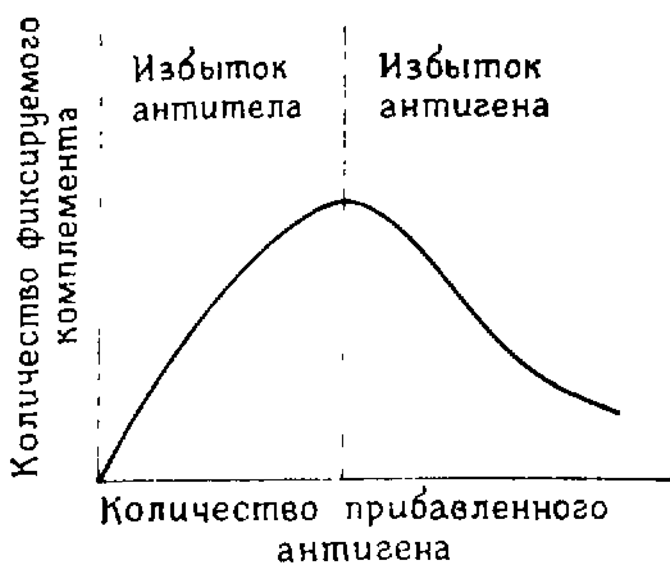


РИС. 10-4.

Калибровочная кривая фиксации комплемента.

К постоянным количествам антитела и комплемента прибавляют различные количества антигена. После инкубации добавляют эритроциты барана и антитела против эритроцитов барана. После второй инкубации смесь центрифугируют для удаления оставшихся целыми эритроцитов. Количество выделившегося гемоглобина определяют по поглощению супернатанта. Если комплемент не фиксируется, то в супернатанте присутствует максимальное количество гемоглобина. Заметим, что два различных количества антигена могут приводить к фиксации одного и того же количества комплемента. Для измерения количества антигена при неизвестной концентрации необходимо проводить определения с разбавлениями образца. Если при разбавлении антигена количество фиксируемого комплемента уменьшается, фиксируемое количество соответствует участку кривой, отвечающему избытку антитела.

На этой стадии комплемент фиксируется комплексом антиген — антитело.

2. Затем к смеси добавляют эритроциты барана, предварительно покрытые специфическим антителом кролика. На этой сдадии комплекс эритроцит — антитело связывает комплемент, который не был поглощен на стадии 1. После инкубирования, во время которого протекает лизис, смесь центрифугируют, а затем измеряют оптическую плотность супернатанта.

Так как для гемолиза требуется свободный комплемент (т. е. тот, который не поглотился при первой реакции антиген — антитело), количество гемоглобина в супернатанте измеряется по количеству оставшегося комплемента. Заметим, что *увеличение* реакции антиген — антитело означает *уменьшение* лизиса.

Фиксацию комплемента можно использовать для измерения количества данного антигена, находящегося в сложной смеси, причем с высокой чувствительностью. На рис. 10-4 изображена зависимость количества фиксированного комплемента (иными словами, уменьшения лизиса) от количества добавленного антигена в присутствии определенного количества антитела. Обычно количество фиксируемого комплемента увеличивается с повышением количества антигена при избытке антитела и уменьшается при избытке антигена. Следовательно, для измерения количества данного антигена требуется придерживаться стандартной после-

довательности. Во-первых, получают калибровочную кривую, такую, как показана на рис. 10-4, используя заведомо известные количества антигена. Затем проводят реакцию при нескольких разбавлениях образца антигена. Это необходимо для того, чтобы выяснить, соответствует ли количество фиксируемого комплемента ветви кривой, отвечающей избытку антигена или избытку антитела. После этого по кривой можно определять количество антигена.

Метод фиксации комплемента обычно в 50—100 раз более чувствителен, чем реакция преципитации. Он дает возможность в ряде случаев определять до 0,01 мкг некоторых антигенов. Главным его недостатком является то, что в некоторых смесях, используемых для анализа с целью определения антигена, могут присутствовать вещества, инактивирующие комплемент (антикомплементарные вещества) или стимулирующие протекание гемолиза.

Торможение фиксации комплемента и пассивная агглютинация

Многие вещества могут быть определены по их способности ингибировать реакции антиген — антитело. Это особенно широко используется при анализе гаптенов, поскольку гаптены обычно реагируют с антителом *без фиксации комплемента*. Поэтому прямое определение гаптенов по фиксации комплемента невозможно. Однако, если реакция антиген — антитело проводится таким образом, что все антитела полностью связываются антигеном и весь комплемент фиксирован, любой агент, который может связывать антитело без фиксации комплемента, можно определить по восстановлению количества фиксированного комплемента. Таким образом, если с антигеном добавляется гаптен, дающий перекрестную реакцию, этот гаптен может конкурировать с антигеном за центр связывания антигена с антителом и, следовательно, снижать количество фиксируемого комплемента. Путем прибавления различных количеств данного гаптена к данной смеси антиген — антитело можно получить калибровочную кривую, которую затем можно использовать для определения неизвестного количества того же гаптена в смеси. Эта процедура называется *тестом торможения фиксации комплемента*. Пример показан на рис. 10-5.

Необходимо помнить, что анализ ингибирования нельзя использовать для антигенов или даже антигенов, вступающих в перекрестную реакцию, в связи с тем, что в обоих случаях комплемент будет фиксироваться.



РИС. 10-5.

Торможение с фиксацией комплемента.

Антиген, антитело и комплемент смешивают в таких количествах, чтобы количество комплемента соответствовало области избытка антигена на кривой, показанной на рис. 10-4. Перед прибавлением эритроцитов и антител против эритроцитов барана добавляют различные количества гаптена. Гаптен (Г) принимает участие в реакции антиген—антитело, приводя к уменьшению количества фиксируемого комплемента, поскольку Ат+Аг+К'→Ат·Аг·К', но Ат+Г+К'→Ат·Г+К'. При добавлении неизвестного количества гаптена его можно определить по калибровочной кривой.

Антигены можно определять по ингибированию *агглютинации*. Суть этого явления состоит в том, что при взаимодействии бактерий и клеток в суспензии с антителами, направленными против компонентов поверхности клеток, клетки слипаются (агглютинируют), что бывает вызвано образованием комплексов антиген — антитело. Рассмотрим модификацию этой реакции, носящую название пассивной агглютинации. Антиген, к которому предварительно было получено антитело, связывается с поверхностью эритроцита или иногда с гранулами полистирола. Эта связь может осуществляться как путем адсорбции, так и с помощью ковалентного связывания. Прибавление антитела, полученного против связанного с поверхностью антигена, приводит к слипанию клеток или гранул, тогда как несвязанный антиген или гаптен будут конкурировать со связанным с поверхностью антигеном и предотвращать агглютинацию.

Одновременно можно проводить оба вида торможения. Однако эта процедура практически полностью вытеснена исключительно чувствительным методом радиоиммунологического анализа.

Радиоиммунологический анализ

Очень сложный вид иммунологического анализа, радиоиммунологический анализ (РИА), позволяет определять исключительно малые количества нерадиоактивного материала, причем при этом смесь может содержать большое число посторонних веществ в

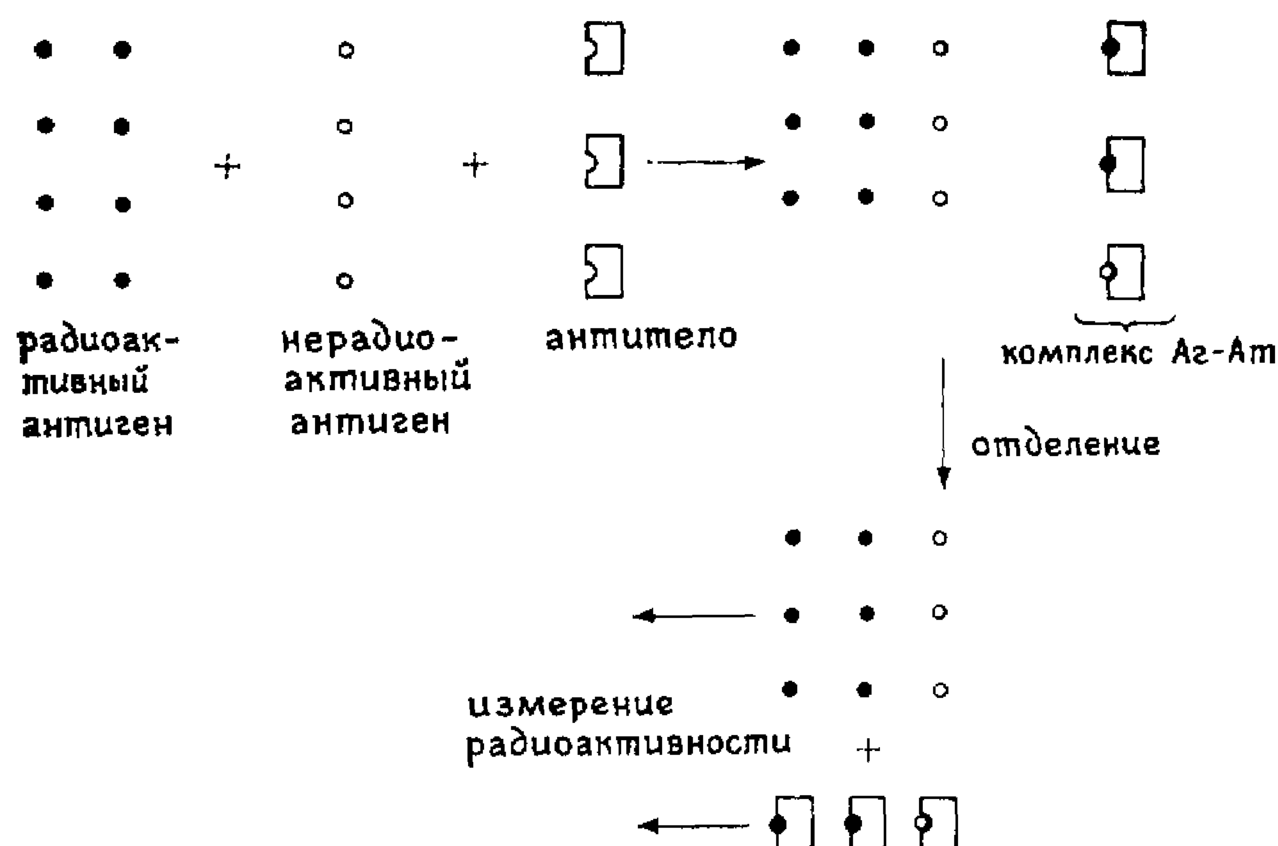


РИС. 10-6.

Принцип радиоиммунологического анализа. Подробное описание приведено в тексте.

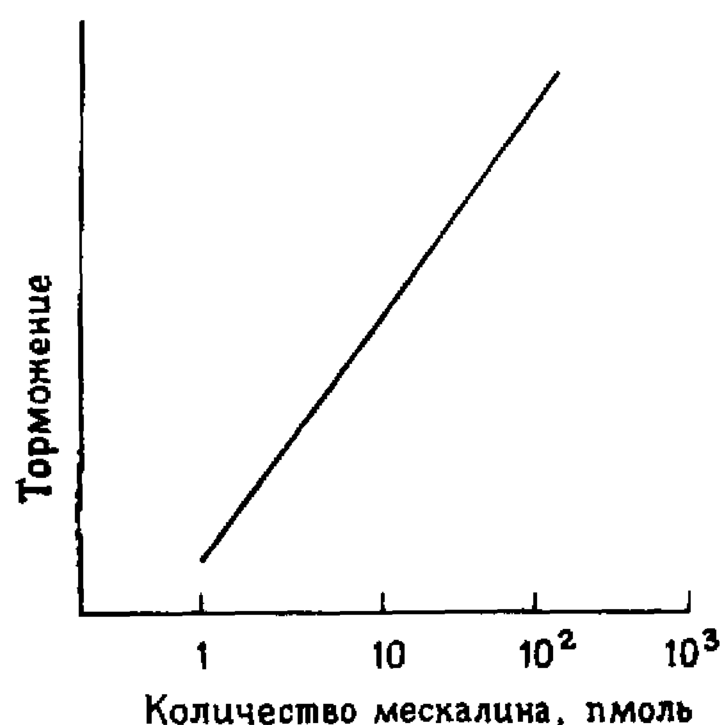


РИС. 10-7.

Типичная калибровочная кривая для радиоиммунологического анализа.

Различные количества немеченого мескалина смешивают с антителом против мескалина и ^{125}I-мескалином. Калибровочную кривую строят по торможению преципитации радиоактивности при добавлении мескалина. (Любезно предоставила Хелен Ван Вунакис.)

любых количествах. Чувствительность метода равна или превосходит все известные хроматографические и спектрофотометрические методы. Метод применяется в основном для определения молекул, которые 1) нельзя метить редиоактивными изотопами in vivo с достаточной удельной активностью или нельзя пометить без того, чтобы не ввести метку и в другие вещества, 2) не способны фиксировать комплемент при реакции со специфическим антителом (например, гаптены) и 3) являются веществами, которые не идентифицированы, но вступают в перекрестную реакцию и поэтому конкурируют с известными антигенами.

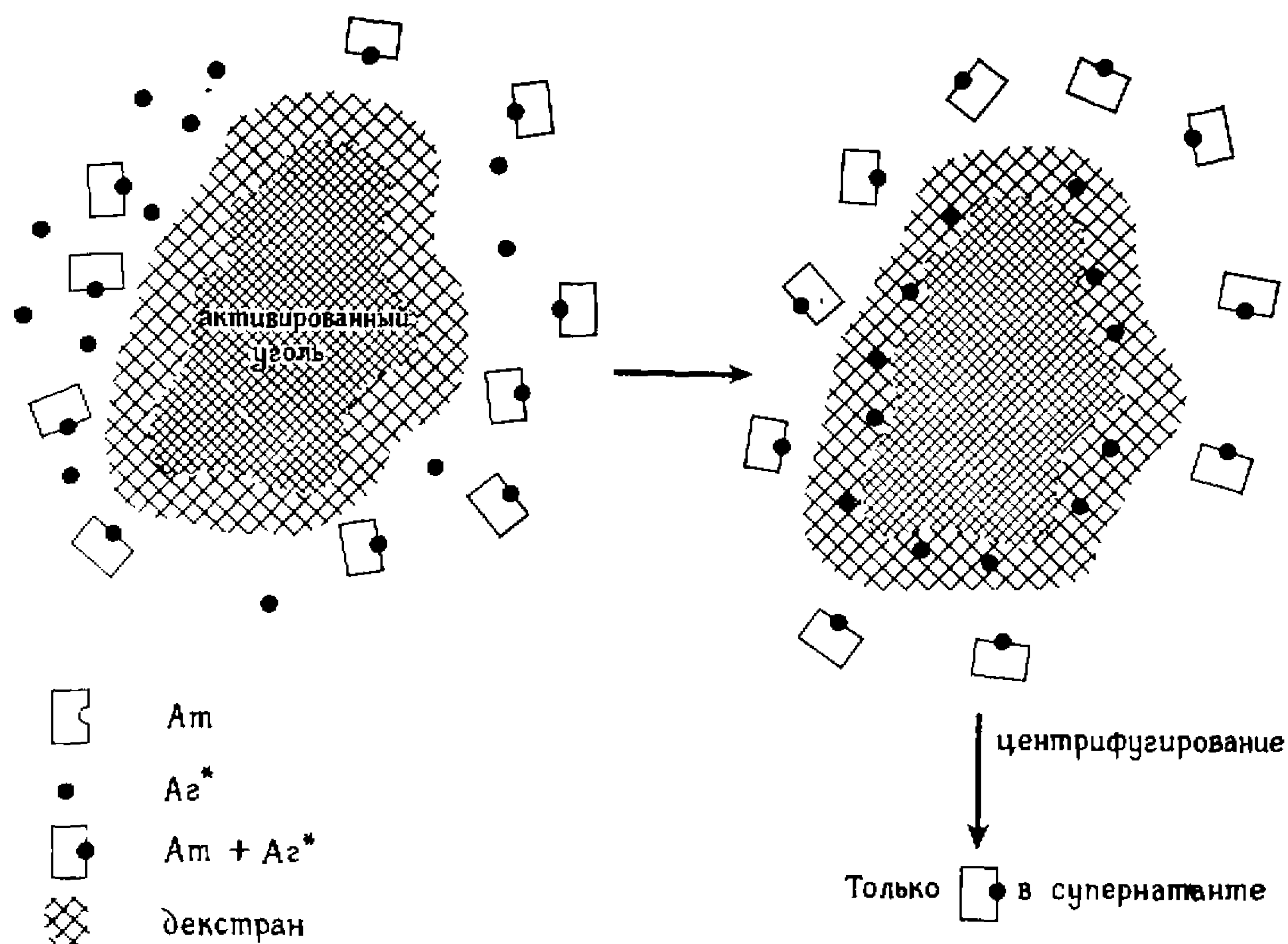
Так как радиоиммунологический анализ представляет собой такой мощный метод, следует более подробно рассмотреть принцип использования процесса ингибирования. Это схематически показано на рис. 10-6. Антитело (Ат), полученное против антигена (Аг), полностью связывается радиоактивным Аг, обозначаемым Аг*, при использовании избытка Аг*. Если к Ат вместе с нерадиоактивным Аг добавить Аг*, то в комплексе антиген — антитело будет находиться меньшее количество Аг* при увеличении отношения Аг/Аг* (т. е. будет увеличиваться количество Ат — Аг и уменьшаться количество Ат — Аг*). Например, если Аг/Аг* = 1, то будет связана только $^1/_2$ Аг*, если Аг/Аг* = 2, то связана будет $^1/_3$ и т. д. Если комплекс Ат/Аг* с помощью какого-либо физического метода можно отделить от Аг*, то при этом можно определить количество Аг.

Для измерения количества Аг строят калибровочную кривую (рис. 10-7). Для этого смешивают фиксированные количества Ат и Аг* и смесь распределяют по пробиркам. К каждой из пробирок добавляют известное количество Аг. После окончания реакции комплекс Ат — Аг* отделяют от Аг* (эта процедура описана ниже). Затем строят график зависимости радиоактивности отделенного Ат — Аг* от количества прибавленного Аг (рис. 10-7). Для определения количества Аг в экспериментальном образце пробу образца прибавляют к той же смеси Ат — Аг*, которая использовалась для построения калибровочной кривой, отделяют Ат—Аг* и измеряют радиоактивность, после чего количество Аг определяют по калибровочной кривой. Такое определение можно проводить в смеси со сколь угодно большим числом компонентов при условии, что в смеси ничто не влияет на реакцию Ат — Аг*.

Как правило, для отделения Ат — Аг* от Аг* используют два метода (хотя можно применять и другие).

Метод разделения на активированном угле, покрытом декстраном. Активированный уголь обладает широко используемым на практике свойством адсорбировать небольшие молекулы. Адсорбируются также белки и комплекс Ат — Аг*, хотя медленнее и в меньшей степени. Однако если уголь покрыть сшитым полисахаридом декстраном (этот материал является молекулярным ситом, в которое не могут проникать большие молекулы, гл. 8), то ни Ат, ни Ат — Аг* не будут адсорбироваться. Следовательно, если к смеси, содержащей свободный Аг* и Ат — Аг*, прибавить уголь, покрытый декстраном, и смесь немедленно центрифугировать, то радиоактивность, не связанная с Ат (т. е. Аг*), оказывается в гранулах угля, а радиоактивность, отвечающая Ат — Аг*, остается в супернатанте. Схема действия этого быстрого и удобного метода изображена на рис. 10-8, *А*.

Метод двойного антитела. Обычно антитела получают от кролика. γ-Глобулин кролика является антигеном для других жи-



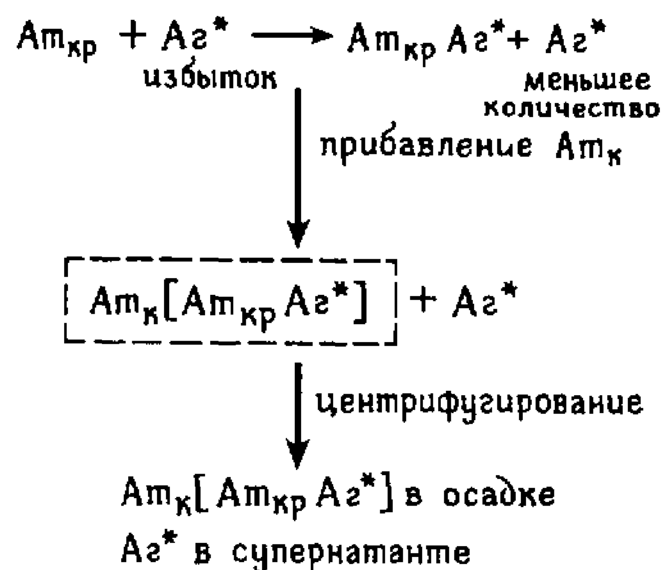


РИС. 10-8.

Методы отделения Ат—Аг* от Аг*.

А — метод с использованием угля, покрытого декстраном (поскольку Аг* является небольшой молекулой, он может проникать в поры декстрановой матрицы); *Б* — метод двойного антитела. Комплекс Ат—Аг* образует преципитат при добавлении антитела козы. $Ат_{к}$ — антитела козы против γ-глобулина кролика; $Ат_{кр}$ — антитела кролика.

вотных и используется для получения анти-γ-глобулина кролика в организмах козы, барана, лошади и коровы. Добавление к γ-глобулину кролика антисыворотки козы приводит к образованию преципитина, который можно отделить центрифугированием (рис. 10-8, *Б*). На этом явлении основан следующий прием. К каждой из пробирок, используемых для получения калибровочной кривой, и к пробиркам с образцами (все они предварительно достаточно долго инкубировались для образования Ат — Аг*) прибавляют Ат козы антикролика при точке эквивалентности реакции преципитации (рис. 10-1). Затем смесь инкубируют (обычно в течение 16—48 ч), после чего образец центрифугируют. Ат — Аг* находится в осадке, а свободный Аг* остается в супернатанте. Этот метод дает удовлетворительные результаты, но требует содержания многих животных в качестве источника антисыворотки.

Радиоиммунологический анализ отличается от прочих методов иммунологического анализа тем, что для него требуется радиоактивный антиген. В ряде случаев для этого используют готовые или синтезированные из меченых предшественников ^{3}H- или ^{14}C-меченые соединения. Чаще применяют иодирование антигена или гаптена ^{125}I или ^{131}I. Использование ^{125}I имеет особое преимущество, так как этот изотоп является сильным γ-эмиттером. Как отмечалось в гл. 5, β-эмиттеры считают в жидкостных сцинтилляционных счетчиках, и, поскольку образцы для радиоиммунологического анализа часто содержат значительное количество белка, приходится считаться с проблемой тушения в сцинтилляционной системе. В случае ^{3}H и ^{14}C тушение может быть достаточно сильным. При использовании γ-эмиттеров тушение проявляется в меньшей степени вследствие высокой энергии радиации.

Получение иодированных антигенов не всегда простая задача, особенно из-за необходимости проводить его таким образом, чтобы вещество не подвергалось риску потерять хотя бы часть своих антигенных свойств. Иодирование белков, аминогрупп или гаптенов, содержащих аминогруппу, можно проводить с применением ^{125}I-3-(4-оксифенил)пропионовой кислоты в виде ее N-оксисукцинимидного эфира. Для белков, содержащих остатки тирозина, или для гаптенов с фенольными группами подходят различные методы иодирования ароматического кольца. Нуклеиновые кислоты можно иодировать по цитозиновым остаткам.

В некоторых случаях отсутствуют функциональные группы, которые можно было бы иодировать прямым путем; в таких случаях соединение сначала связывают с тирозином или гистамином, после чего иодируют полученный конъюгат.

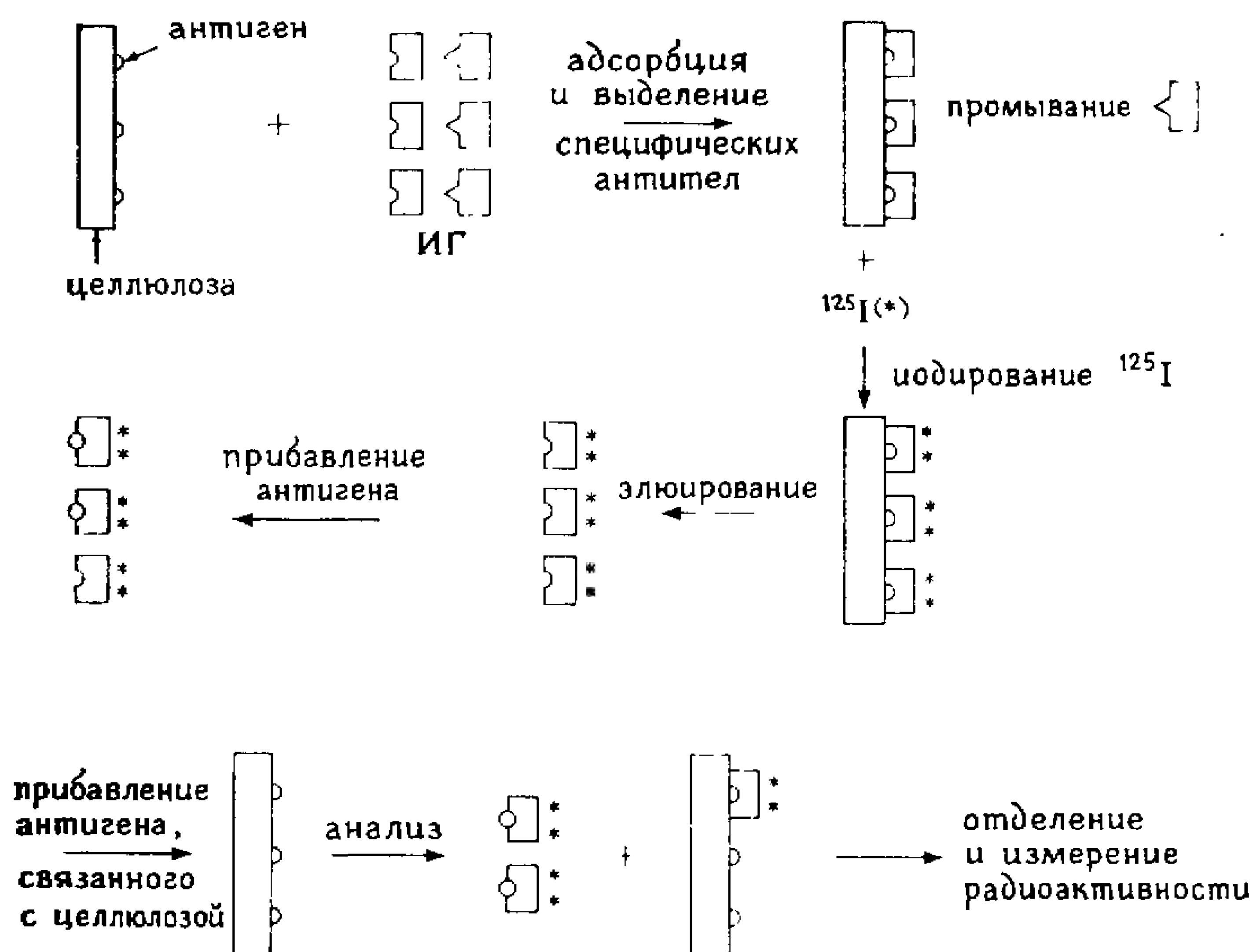


РИС. 10-9.

Схема иммунорадиометрического анализа. Детали описаны в тексте.

Иммунорадиометрический анализ

В некоторых случаях не удается найти подходящего способа для получения радиоактивного антигена, поэтому применить метод радиоиммунологического анализа не представляется возможным. Такие вещества определяют с помощью иммунорадиометрического анализа (ИРА). Принцип работы метода изображен на рис. 10-9. Очищенный антиген адсорбируется или связывается со стабильным носителем, таким, как целлюлоза (или сефароза, обработанная бромцианом, см. гл. 8). Очищенный иммуноглобулин (ИГ), полученный из сыворотки, содержащей антиген-специфическое антитело, прибавляют к такому конъюгату. Неадсорбированные антитела удаляют промыванием, а адсорбированное антиген-специфическое антитело иодируют радиоактивным иодом (обратите внимание, что здесь в отличие от РИА радиоактивным является антитело, а не антиген). Радиоактивное антитело затем удаляют с адсорбента и используют для анализа. Для этого Ат* смешивают с анализируемым антигеном, применяя избыток антитела (в РИА используется избыток антигена). Смесь прибавляют к целлюлозе, содержащей Аг, с которой может связываться только непрореагировавшее Ат*. Прореагировавшее Ат* отмывают и определяют его количество по радиоактивности, получен-

ное значение дает возможность определить количество Аг. Иммунорадиометрический метод анализа пока не нашел широкого применения, однако этого следует ожидать в будущем.

Примеры использования иммунологических методов в биологическом анализе

Приведенные ниже примеры демонстрируют разнообразие систем, которые можно исследовать с помощью иммунологических методов. Заметим, что в некоторых случаях иммунологический анализ используется для качественных характеристик, что связано с его исключительной чувствительностью. В других случаях он служит точным количественным методом.

Пример 10-А. *Идентификация и классификация различных бактерий с помощью агглютинации.* Многие бактерии, выделенные из природных источников или полученные от больных, можно идентифицировать преципитацией или агглютинацией специфическими антителами, полученными против определенных штаммов (рис. 10-10). Реакцию можно наблюдать либо под оптическим микроскопом (при этом видно слипание), либо по изменению мутности суспензии, которая измеряется спектрофотометрически.

Пример 10-Б. *Идентификация вирусов по ингибированию гемагглютинации, вызываемой вирусом.* В клиниках и лабораториях часто приходится сталкиваться с необходимостью идентификации вирусов. Эта задача легко решается при использовании простого анализа ингибирования. Некоторые типы вирусов обладают свойством вызывать слипание эритроцитов (*гемагглютинация*). Если данный вирус вызывает агглютинацию, то прибавление антитела, полученного против этого вируса, будет его связывать, предотвращая тем самым гемагглютинацию, однако другие ан-

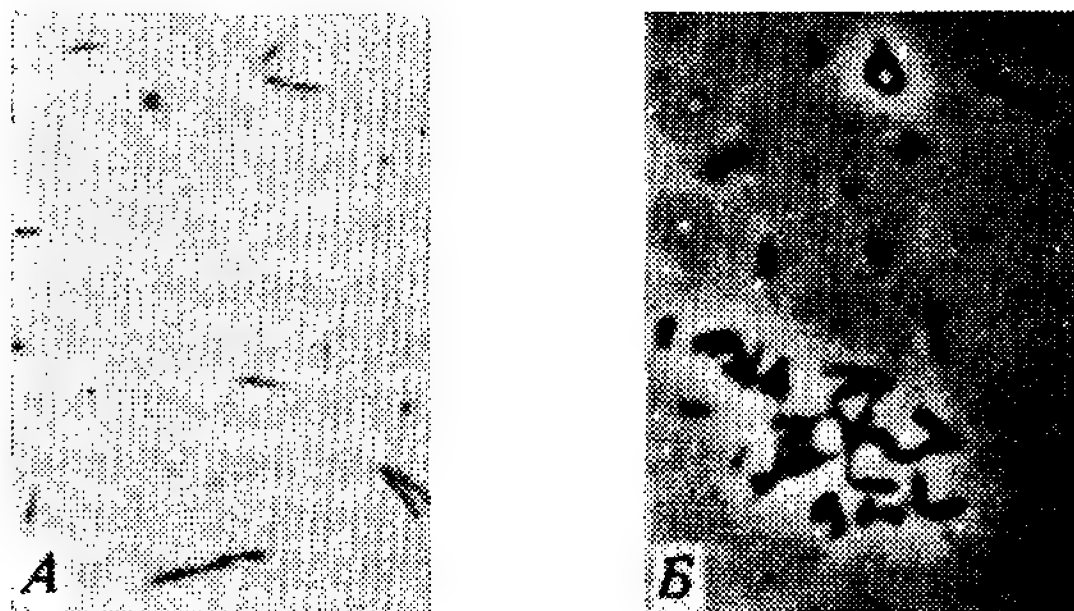


РИС. 10-10.

Агглютинация бактерии *E. coli* при добавлении специфической антисыворотки.

А — в отсутствие антисыворотки; *Б* — при добавлении антисыворотки.

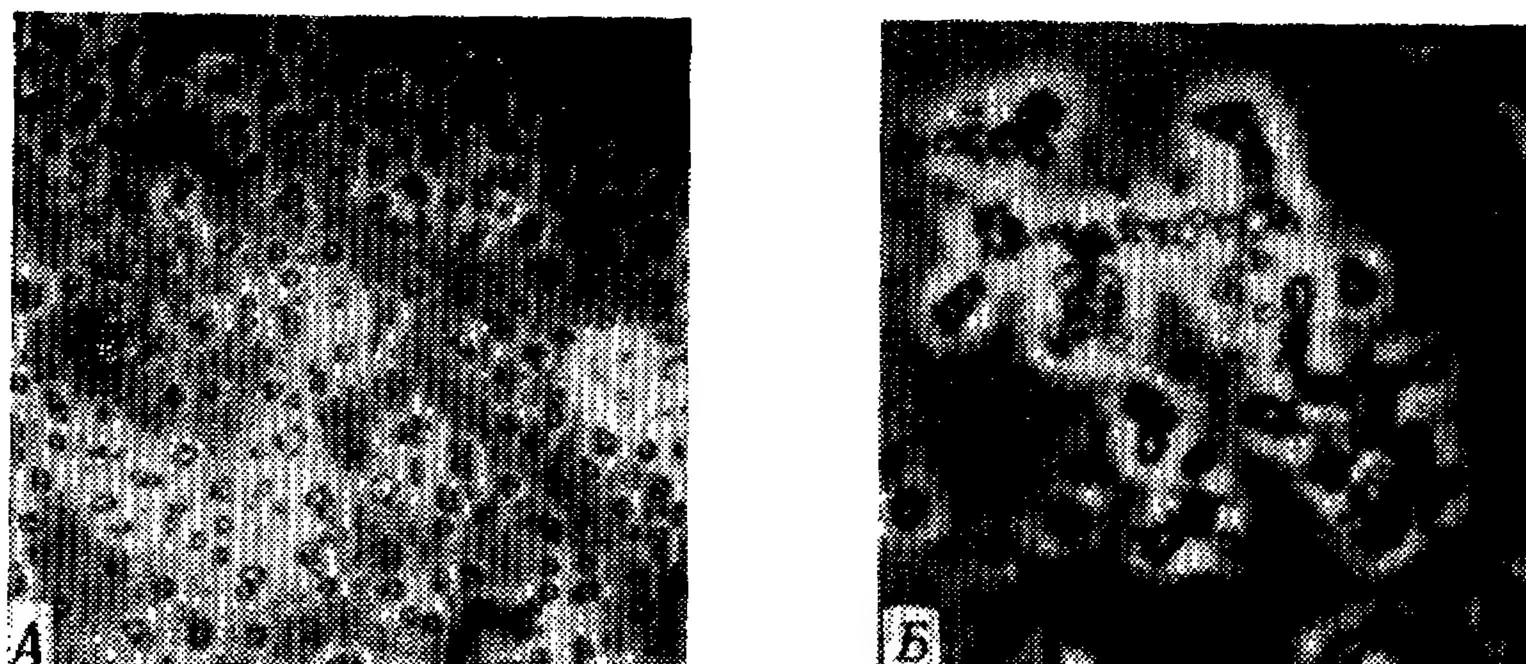


РИС. 10-11.

Слипание частиц полистирола, покрытых гонадотропином, при действии антигонадотропина.

А — в отсутствие антисывортки; *Б* — в присутствии антисыворотки.

титела не будут давать такого эффекта. Таким образом, при наличии большого набора антител, полученных против разнообразных вирусов, можно определить и исследуемый вирус.

Пример 10-В. *Обнаружение гонадотропинов в моче беременных женщин методом торможения и пассивной агглютинации.* Небольшие частицы полистирола можно покрыть гонадотропином человека — гормоном, который найден в моче беременных женщин. Прибавление антигонадотропина приводит к слипанию таких покрытых частиц (рис. 10-11); это явление хорошо видно с помощью оптического микроскопа. Если к таким покрытым частицам добавить мочу беременной женщины перед прибавлением антитела, то гонадотропин мочи будет конкурировать с покрытыми частицами за место на антителе, поэтому агрегаты образовываться не будут. Это свойство обычно используется в качестве теста на наличие беременности.

Пример 10-Г. *Изучение синтеза нити отростка фага в инфицированной бактерии E. coli с помощью метода торможения.* Антитела, полученные против бактериофага Т2 *E. coli*, направлены в первую очередь против нити отростка фага Т2. Исходя из этого, прибавление анти-Т2 инактивирует фаг, предотвращая его адсорбцию хозяином. Внутриклеточный синтез нитей отростка можно проследить, получая экстракты клеток через различные промежутки времени после инфекции, смешивая аликвоты с анти-Т2 и прибавляя затем фаг. Если в аликвоте присутствуют нити отростка, они будут связываться с анти-Т2, анти-Т2 будет титроваться (иными словами, ингибироваться), а фаг будет продолжать свое существование. Эта процедура служит примером ин-

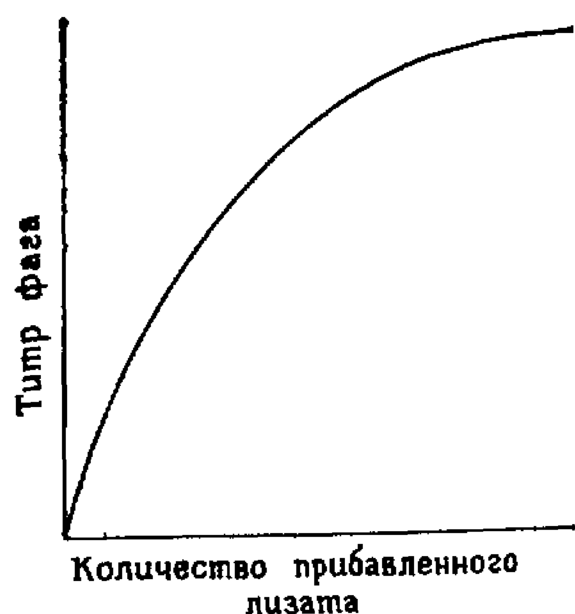


РИС. 10-12.

Анализ блокирующей способности сыворотки.

К фагу Т2 добавляли анти-Т2 вместе с различными количествами экстракта бактерий, зараженных мутантным фагом, лишенным способности образовывать головку. Антисыворотка инактивирует фаг в отсутствие экстракта. Если в экстракте имеются отростки фага (против которых направлена антисыворотка), то они будут конкурировать с фагом за связывание с антителом, при этом фаг будет жизнеспособным. Это можно использовать для определения числа фагов, эквивалентного числу отростков, имеющихся в экстракте.

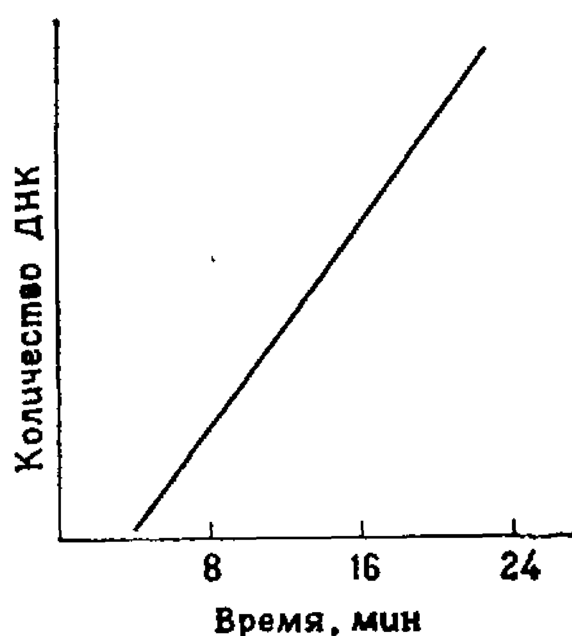


РИС. 10-13.

Определение синтеза ДНК фага Т4 *E. coli* с помощью фиксации комплемента.

E. coli В была инфицирована пятью фагами на бактерию. Через разные промежутки времени отбирались пробы, которые анализировались на присутствие глюкозилированной ДНК с использованием фиксации комплемента с антителом к глюкозилированной ДНК. Принцип этого метода заключается в том, что ДНК *E. coli* не глюкозилирована, поэтому она не реагирует с антителом, тогда как ДНК фага Т4 содержит глюкозилированный 5-оксиметилцитозин. Поэтому антитело обнаруживает ДНК фага Т4 и не «замечает» значительно большего количества бактериальной ДНК [*Levine L., Murakami W. T., Van Vunakis H., Grossman L.*, Proc. Nat. Acad. Sci., 46, 1038—1043 (1960).]

гибирующей способности антител. Таким образом, число жизнеспособных фагов, остающихся после такой обработки, является мерой количества нитей отростка в экстракте (рис. 10-12). Этот метод известен среди исследователей фагов под названием *метода блокирующей способности сыворотки.*

Пример 10-Д. *Измерение синтеза ДНК фага Т4 в инфицированной E. coli с помощью фиксации комплемента.* Можно получить антитела к денатурированной глюкозилированной ДНК. ДНК бактериофага Т4 *E. coli* содержит глюкозилированный 5-оксиметилцитозин вместо цитозина, поэтому ее можно отличить от ДНК *E. coli*, так как последняя не будет реагировать с антителами. Ход синтеза ДНК фага Т4 в течение инфекции можно проследить с помощью фиксации комплемента, путем приготовления экстрактов клеток, денатурирования ДНК и определения количества глюкозилированной денатурированной ДНК (рис. 10-13).

Пример 10-Е. *Влияние денатурирующих агентов на ДНК.* Денатурация ДНК обычно изучается путем измерения увеличения оптической плотности при 260 нм (гл. 14). Однако такой метод нельзя использовать в тех случаях, когда потенциальный денатурирующий агент сам обладает поглощением при этой длине вол-

ны. Для обнаружения денатурации можно воспользоваться иммунологическим методом, поскольку некоторые антитела к ДНК реагируют только с денатурированной ДНК. Действительно, методом фиксации комплемента было проанализировано большое число дестабилизирующих веществ, причем степень денатурации определялась как функция концентрации денатурирующего агента. Некоторые данные, полученные таким методом, приведены в табл. 10-2.

ТАБЛИЦА 10-2

Концентрация реагентов, при которой при температуре 73°С и ионной силе 0,043 происходит 50%-ная денатурация ДНК из бактериофага Т4 *E. coli* (определенная методом фиксации комплемента) [a]

Реагенты	Концентрация моль/л
Метанол	3,50
Этиленгликоль	2,20
Глицерин	1,80
1,4-Диоксан	0,64
Фенол	0,08
Формамид	1,90
Мочевина	1,00
Тиомочевина	0,41

[a] Данные взяты из работы: *Levine L.*, *Gordon J. A.*, *Jencks W. P.*, Biochem., 2, 168—175 (1963). ДНК помещали в растворы, содержащие различные концентрации реагентов, и инкубировали при 73 С. Затем растворы разбавляли и определяли методом фиксации комплемента, используя при этом антитела к ДНК, которые реагировали только с одноцепочечной ДНК. Было опробовано 54 различных реагента.

Пример 10-Ж. *Идентификация β-белка фага λ E. coli.* При инфицировании *E. coli* фагом λ синтезируется большое количество экзонуклеазы. Эту нуклеазу очищают, после чего получают анти-λ экзонуклеазу. При проверке гомогенности методом иммунодиффузии Ухтерлони (рис. 10-14) обнаруживаются две зоны, показывающие, что в «чистом» образце содержится как минимум два белка. Одна полоса является продуктом рекомбинации гена, называемого *экзо*. Другая отвечает продукту другого гена, называемого *бета*. β-Белок образует комплекс с экзонуклеазой, однако не проявляет ферментативной активности in vitro. Его синтез и генетический контроль изучают методом иммунодиффузии, так как для анализа β-белка не существует другого метода.

Пример 10-З. *Обнаружение полимеразы III ДНК E. coli в присутствии полимеразы I методом нейтрализации.* Если два фермента принимают участие в сходных реакциях, часто бывает затруднительно провести анализ одного из них в присутствии другого. При анализе ДНК-полимераз белок, несущий активность

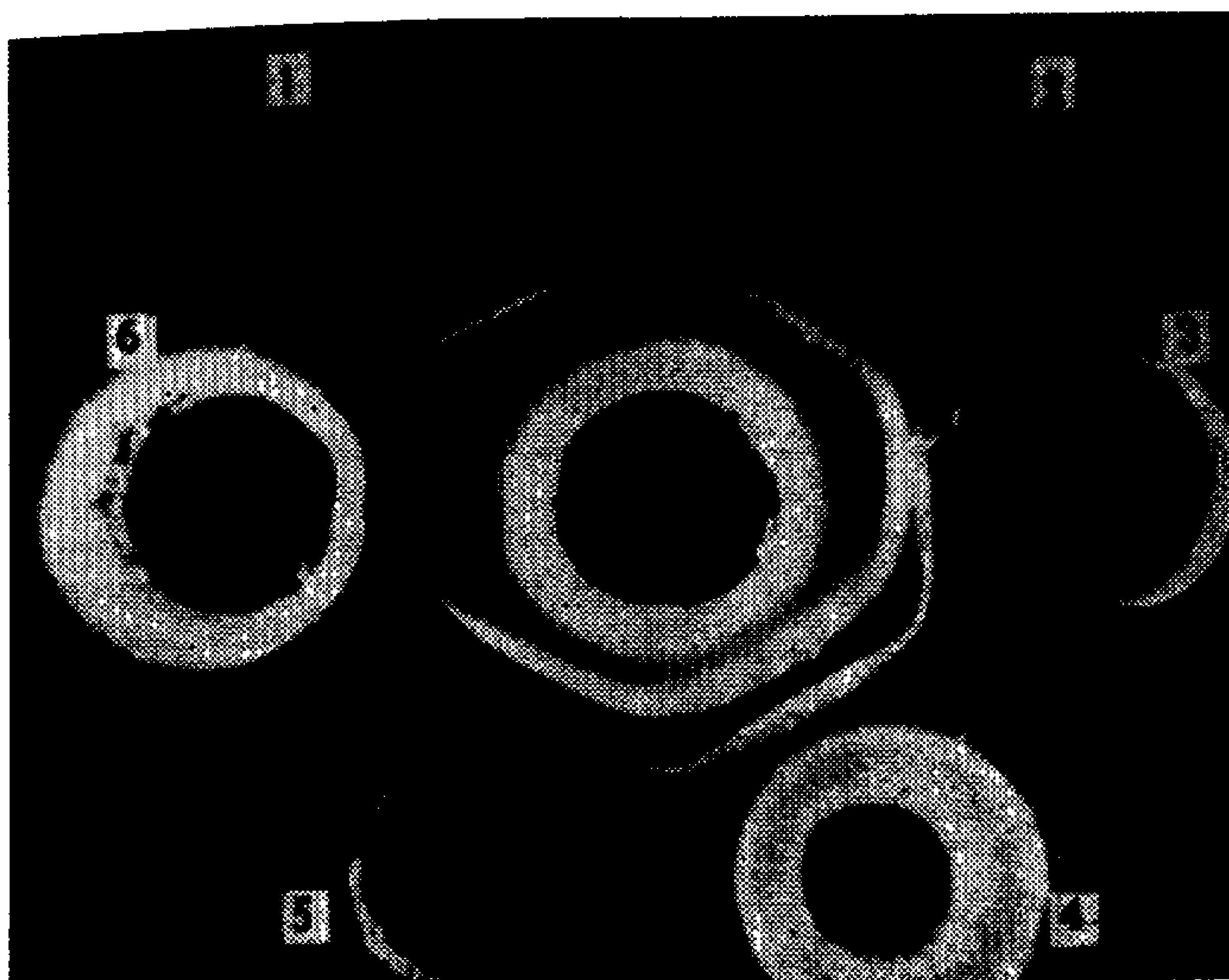


РИС. 10-14.
Анализ экзонуклеазы и β-белка фага λ *E. coli* методом Ухтерлони.

Центральная лунка содержит антитело, полученное против предположительно чистой экзонуклеазы. Лунка 1 содержит экзонуклеазу высокой чистоты, и здесь видна одна линия преципитации. В лунке 3 содержится та же экзонуклеаза, но менее чистая, чем в лунке 1. Лунка 2 содержит частично очищенный экстракт клеток, зараженных фагом λ дикого типа. Здесь присутствуют зона экзонуклеазы и внутренняя зона β-белка. В лунке 4 тот же препарат, что и в лунке 2, но менее чистый. Лунка 5 была заполнена продуктом, полученным при заражении мутантным фагом λ, известным под названием *t11*. Этот мутант производит излишек экзонуклеазы и не дает всех репликативных и структурных белков фага. Видно, что здесь присутствует β-белок, т. е. он образуется в части генома, содержащей экзоген, а не в структурной или репликативной областях. В лунке 6 находился экстракт из *N*-мутанта фага λ. В этом случае отсутствуют обе зоны, что указывает на контроль геном *N* синтеза экзонуклеазы и β-белка [*Radding C. M., Shreffler D. C.*, J. Mol. Biol., 18, 251—261 (1966)].

полимеразы I, можно удалить из экстракта клеток путем прибавления антиполимеразы I перед введением экстракта в реакционную смесь. Нейтрализующая способность антитела используется в биохимии для однозначного анализа полимеразы III.

Пример 10-И. *Определение мутантных белков или белковых фрагментов при помощи перекрестных реакций.* Белки из мутантных генов содержат либо новую аминокислоту вместо определенной аминокислоты, присутствующей в белке дикого типа, либо фрагменты нормального белка, если мутация вызывает терминирование цепи. В обоих случаях активность белка (например, ферментативная) теряется, в результате чего биохимический анализ оказывается несостоятельным. Если измененный белок или фрагмент продолжает содержать ту же антигенную детерминанту (например, аминокислотную последовательность), что и белок

дикого типа, то его можно обнаружить иммунологическим методом. Наилучшими методами для этого служат фиксация комплемента, иммунодиффузия или радиоиммунологический анализ. Пример такого подхода показан в табл. 10-3.

ТАБЛИЦА 10-3

Иммунологические перекрестные реакции между β-галактозидазами различных мутантов *E. coli* [a]

Участок генетической карты, в котором произошла мутация	Количество белка, при котором фиксация комплемента происходит на 50% [б], мкг
Дикий тип	0,06
1	ОФ[в]
2	ОФ
3	ОФ
4	ОФ
5	4,0
6	1,0
7	2,0
8	ОФ
9	ОФ
10	1,4
11	0,5
12	1,4
13	0,6
14	1,3
15	0,5
16	0,5

Выводы: 1. Фермент β-галактозидаза может быть определен иммунологически, даже если не заметна активность.

2. Участки 1—4 и 8—9 либо являются антигенными, либо более эффективно изменяют трехмерную конформацию антигенного участка, потому что мутации в этих участках уничтожают всю антигенную активность.

[a] Данные взяты из работы: *Fowler A. V., Zabin I.*, J. Mol. Biol., 33, 35—47 (1968).

[б] Чем ближе величина к величине для белка дикого типа, равной 0,06, тем сильнее антигенная детерминанта мутантного белка похожа на антигенную детерминанту белка дикого типа.

[в] Отсутствие фиксации.

Пример 10-К. *Обнаружение родства между белками при помощи перекрестной реакции.* Некоторые белки, например находящиеся в глиальных клетках мозга, широко распространены в природе. Антитело к конкретному белку глиальных клеток кролика можно найти с помощью фиксации комплемента при реакции с белками из различных образцов нервных тканей, простирающихся в эволюционных пределах от лягушки до человека. Характерные данные, которые можно получить в качестве свидетельства родственности структур, приведены в табл. 10-4.

ТАБЛИЦА 10-4

Перекрестные реакции между белками S-100 из мозга различных животных и антителами к белку S-100 крупного рогатого скота [a]

Животное	Относительная концентрация антисыворотки, которая необходима для фиксации комплемента на 50% [б]
Корова	1,0
Баран	1,0
Крыса	1,0
Морская свинка	1,2
Мышь	1,3
Свинья	1,8
Кролик	1,9
Человек	2,0
Цыпленок	2,2
Голубь	2,3
Лягушка-бык	2,5

[a] Данные взяты из работы: *Kessler D.*, *Levine L.*, *Fasman G.*, Biochemistry, 7, 758 — 764 (1968).

[б] Чем ближе величина к 1, тем более родственным является белок.

Примеры использования радиоиммунологического анализа

В табл. 10-5 приведены различные типы веществ, которые можно анализировать с использованием радиоиммунологического анализа, причем список этих веществ с каждым днем увеличивается.

Пример 10-Л. *Диагностика опухолей.* Некоторые опухоли образуют характерные антигены, которые можно найти в крови или моче. В некоторых случаях, например хорионного гонадотропина человека, плацентарного лактогена человека и плацентарной щелочной фосфатазы, эти антигены отсутствуют в нормальной крови человека, однако находятся в крови некоторого процента больных определенными видами карциномы.

Если опухоль находится в ткани, которая обычно контролирует или осуществляет непосредственно синтез гормона, наличие опухоли часто бывает связано с увеличением уровня данного гормона; так, например, при раке поджелудочной железы повышается уровень инсулина. Каждое из этих веществ можно определить с помощью радиоиммунологического анализа с гораздо более

ТАБЛИЦА 10 5

Вещества, применяемые в радиоиммунологических определениях

Гормоны	
Желудочно-кишечные глюкагон, гастрин, энтероглюкагон, секретин, панкреоцимин, вазоактивный кишечный пептид, желудочный ингибиторный пептид, мотилин, инсулин	Пролактин Тирокальцитонин Паратиреоидный гормон Хорионный гонадотропин человека
Кортикотропин Фолликулстимулирующий гормон	Пептиды задней доли гипофиза: окситоцин, вазопрессин, нейрофизин Брадикинин
Антидиуретический гормон Тироидстимулирующий гормон	Тироидные гормоны
Фармакологические агенты	
Морфин и опийные алкалоиды	Тетрагидроканнабинол
Сердечные гликозиды	Барбитураты
Простагландины	Никотин и продукты метаболизма
Лизергиновая кислота и ее производные	Фенотиазины
Амфетамины	
Витамины и кофакторы	
D, B12, фолиевая кислота, циклический АМФ	
Гематологические вещества	
Фибриноген, фибрин и фибринопептиды	Протромбин
Плазминоген и плазмин	Трансферрин и ферритин
Антигемофилический фактор	Эритропоэтин
Вирусные антигены	
Hepatitis antigene	Polio
Herpes simplex	Rabies
Vaccinia	Q fever
Некоторые арбовирусы группы А	Psittacosis group
Нуклеиновые кислоты и нуклеотиды	
ДНК, РНК, производные цитозина	

высокой чувствительностью, чем при использовании любого известного химического или биохимического метода.

Пример 10-М. *Анализ клинически важных веществ в организме ребенка или при наличии очень малых количеств.* Многие важные в клинической практике вещества можно легко определить обычными химическими методами, если имеются большие количества крови. Однако для детей, тяжело больных пациентов и мелких животных взятие таких объемов крови может представлять опасность. Высокая чувствительность радиоиммунологического анализа позволяет решить эту проблему.

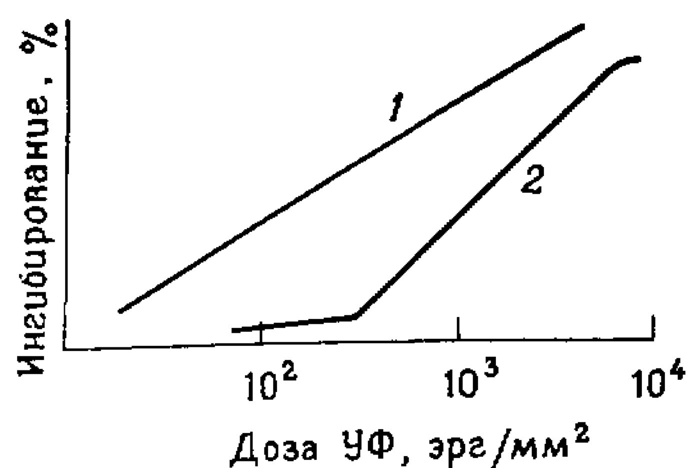


РИС. 10-15.

Обнаружение димеров тимина ($\widehat{TT}$) в ДНК методом радиоиммунологического анализа с использованием антитела кролика, полученного против ДНК после ультрафиолетового облучения, т. е. анти-$\widehat{TT}$.

Получали смесь анти-$\widehat{TT}$ и иодированной ДНК, подвергшейся ультрафиолетовому облучению, после чего измеряли количество радиоактивного иода, преципитирующего при добавлении сыворотки козы против антител кролика. Уменьшение преципитирующей радиоактивности измерялось как функция количества прибавляемой облученной ДНК. Калибровочная кривая дает возможность по степени ингибирования определить число димеров тимина. Каждая кривая соответствует ДНК, полученной из различных бактерий. ДНК из *Micrococcus luteus* (*2*) содержит меньшее количество тимина, чем из *Proteus vulgaris* (*1*), поэтому она требует большей дозы для образования того же количества димеров [*Seaman E., Van Vunakis H., Levine L.*, J. Biol. Chem., 247, 5709—5715 (1972)].

Пример 10-Н. *Определение количества димеров пиримидина в ДНК после облучения ультрафиолетовым светом.* При изучении механизмов восстановления облученной ДНК in vivo почти всегда бывает необходимо определять количество димеров пиримидина, являющихся основным продуктом ультрафиолетового облучения ДНК. Это можно осуществить с помощью хроматографии на бумаге или электрофореза в том случае, когда внутриклеточная ДНК может быть помечена ^3H до высокой удельной активности. Однако при работе с клетками животных или растений это не всегда возможно. Более того, определение очень малого числа димеров обычными методами, например 1 на 10^8 пар оснований, затруднено, однако радиоиммунологический анализ дает возможность определять такие количества (рис. 10-15).

Пример 10-О. *Роль простагландинов в организме человека.* Венозная кровь человека содержит в количествах от 10 до 100 пг/мл различные полинепредельные жирные кислоты, называемые простагландинами. Долгое время их значение оставалось невыясненным вследствие невозможности количественного анализа этих веществ с достаточно высокой чувствительностью. Применение радиоиммунологического анализа позволило обойти эти трудности и дало возможность проводить анализ большого количества образцов в короткие промежутки времени. Последнее особенно важно (т. е. постоянный контроль уровня в крови), поскольку недавно было установлено, что многие простагландины обладают фармакологической активностью, однако для них характерен узкий предел безопасных терапевтических доз.

Иммунологические методики для локализации веществ в клетках, тканях и молекулах; флуоресцентные антитела и антитела, связанные с ферритином

Флуоресцентный краситель флуоресцеин может связываться химической связью с большинством молекул антител, причем последние не теряют своей активности. Флуоресцеин можно использовать для локализации структур в клетках и тканях с помощью флуоресцентной микроскопии (гл. 2). Примером может служить идентификация клеток, с поверхностью которых связан определенный вирус, с применением антител против вируса, конъюгированных с флуоресцеином. Флуоресценция указывает на присутствие вируса несмотря на то, что размер вируса лежит за пределом разрешающей способности микроскопа (гл. 2).

С антителом может связываться также железосодержащий белок ферритин. Если специфическое ферритин-связанное антитело реагирует с клетками, после чего клетки исследуют методом электронной микроскопии, то молекулы антитела легко локализуют в тех же местах, что и ферритин (темные пятна на рис. 10-16). Следует отметить, что при этом достигается высокое разрешение.

Список литературы

Berson S. A., Yalow R. S., Radioimmunoassay: A Status Report, in "Immunology", edited by R. A. Good and O. W. Fischer, Sinauer Associates, 1971, pp. 287—293. Прекрасное руководство по методике радиоиммунологического анализа.

Bremer J. M., Pesce A. J., Achworth R. B., Experimental Techniques in Biochemistry, Ch. 4, Prentice-Hall, 1974.

Clausena J., Immunochemical Techniques for the Identification and Estimation of Macromolecules, in "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", vol. 1, edited by T. S. Work and E. Work, North-Holland, 1969, pp. 405—556.

Kabat E. A., Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry, Holt, Rinehart and Winston, 1968.

Kwapinski J. B., Methodology of Immunochemistry and Immunological Research, Wiley-Interscience, 1972.

Wasserman E., Levine L., Quantitative Micro-complement Fixation and Its Use in the Study of Antigenic Structure by Specific Antigen — Antibody Inhibition, J. Immunol., **87**, 290—295 (1961). Изложение основных принципов микрокомплементарной фиксации.

Williams C. A., Methods in Immunology and Immunochemistry, Academic Press, 1967.



РИС. **10-16.**

Пример использования ферритиновой метки.

Эритроцит человека разрушали и инкубировали с вирусом гриппа (указан стрелкой) и антителом, связанным с ферритином, которое было получено против белка спектрина. Вирус гриппа адсорбируется на внешней мембране эритроцита. Ферритин на фотографии выглядит как темные пятна и наблюдается только на противоположной стороне мембраны от вируса. Из этого следует, что спектрин главным образом, если не исключительно, находится на внутренней поверхности мембраны эритроцита. Полоска внизу равна 0,01 мкм [*Nicolson G. L., Marchesi V. T., Singer S. J.*, J. Cell Biol., 51, 265—272 (1971)].

Задачи

10-1. Проведен анализ по фиксации комплемента с использованием антигена X и анти-X. При добавлении различных количеств X была построена калибровочная кривая; при этом были получены следующие данные:

Количество прибавленного X, мкг	*D*	Количество прибавленного X, мкг	*D*
0,00	1,15	0,05	0,17
0,01	0,82	0,06	0,19
0,02	0,50	0,07	0,23
0,03	0,22	0,08	0,50
0,04	0,18	0,09	0,75

Вы хотите определить содержание X в экстракте клеток. Это делается путем прибавления 1 мкл экстракта с последующими его разбавлениями 1 : 1 и 1 : 2 смесью без добавления X; при этом были получены значения оптической плотности 0,20, 0,66 и 0,85. Какова концентрация X в экстракте?

10-2. Предположим, что имеется смесь двух белков и антисыворотка, полученная против этой смеси. Если два белка имеют одинаковую молекулярную массу и форму, то они будут обладать примерно одинаковыми коэффициентами диффузии (гл. 12). Если эту смесь подвергнуть диффузионному тесту Ухтерлони, с очень большой вероятностью при этом получится две зоны. Почему? При каких обстоятельствах может появиться только одна зона? Предположим, что два белка имеют различные коэффициенты диффузии; что может помешать разрешению зон?

10-3. Можно ли ожидать, что реакция между специфическим антителом и белковым антигеном (анализ может проводиться любым способом) будет зависеть от того, является ли белок нативным или денатурированным? Объясните.

10-4. Почему замена одной аминокислоты в белке будет а) приводить к потере всей антигенности, б) не вызывать никакого изменения или в) давать материал, вступающий в перекрестную реакцию?

10-5. Предположим, что требуется определить содержание определенного препарата в крови животного. Обычный химический анализ применить не удается из-за наличия в крови белка. Как здесь можно использовать иммунологические методы? Опишите все необходимые для анализа стадии.

IV ЧАСТЬ

ГИДРОДИНАМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

ГЛАВА 11

Седиментация

Одним из наиболее распространенных методов характеристики макромолекул в настоящее время служит седиментация *. С помощью соответствующих вариантов этого метода можно получить данные о молекулярной массе, плотности и форме макромолекулы, обнаружить изменения этих параметров, причем любой из них можно затем использовать в качестве основы разделения компонентов смеси как для аналитических, так и для препаративных целей. Особенно привлекательным сделался метод в последнее время в связи с появлением новейших автоматических приборов, позволяющих легко и быстро проводить необходимые измерения.

В принципе при ультрацентрифугировании всегда происходит одно и то же: частицы движутся под действием центробежной силы, и их концентрационное распределение по длине центрифужной пробирки определяют через какое-либо время или через промежутки времени. Измерение движения молекул вдоль направления действия центробежной силы называется *определением скорости седиментации*, в результате чего получается *коэффициент седиментации*, значение которого дает информацию о молекулярной массе и форме частицы. Когда распределения концентрации измеряются при таких условиях, при которых распределение не изменяется во времени, говорят, что частицы достигли *седиментационного равновесия;* эти данные дают сведения о молекулярной массе, плотности и составе.

---

* Седиментация — это общий термин для обозначения движения в поле центробежной силы. Если седиментационный анализ проводится с использованием высокоскоростной центрифуги, которая называется ультрацентрифугой, обычно применяют название «ультрацентрифугирование».

Седиментация базируется на очень простых принципах. Однако на практике необходимо учитывать некоторые усложнения для того, чтобы получить значимую информацию.

В данной главе будут рассмотрены как принципы, так и сложности многих способов ультрацентрифугирования, а также примеры измерений, которые доступны с применением рассмотренных методик.

Основы теории скорости седиментации

Если частица находится в поле центробежной силы, образующейся при вращении ротора с угловой скоростью ω, на нее будет действовать центробежная сила $F_{\text{ц}}=m\omega^2 r$, где m — масса частицы, а r — расстояние до центра вращения. Если частица находится не в вакууме, а в растворе *, молекулы растворителя, естественно, будут вытесняться при движении частицы. Их сопротивление вытеснению составляет выталкивающую силу, направленную против центробежной силы. Фактор *плавучести* понижает общую силу, действующую на макромолекулу, на величину массы вытесненного раствора, умноженной на $\omega^2 r$; эта масса равна объему частицы, умноженному на плотность растворителя ρ. Объем частицы равен $m\bar{v}$, где $\bar{v}$ — парциальный удельный объем частицы **, откуда выталкивающая сила равна $\omega^2 r m\bar{v}\rho$.

Ясно, что частицы и молекулы растворителя не могут двигаться относительно друг друга без заметного трения. Сила трения, направленная против движения частиц и молекул растворителя, пропорциональна разнице между скоростями частиц и молекул растворителя и выражается значением fv, где f—коэффициент трения, а v — скорость относительно ячейки центрифуги, содержащей раствор. Так как скорость постоянна при общей силе, равной нулю, скорость частицы

$$v=\frac{\omega^2 r m(1-\bar{v}\rho)}{f}. \tag{1}$$

Из уравнения (1) следует (при равенстве всех прочих факторов):

1. Более массивная частица (или молекула) будет стремиться двигаться быстрее, чем менее массивная.

---

* Под растворителем здесь понимается суспендирующая среда, т. е. если частица находится в воде, то растворителем является вода, если она находится в NaCl с определенной концентрацией, растворителем будет раствор NaCl.

** Подробное рассмотрение парциального удельного объема приведено в гл. 12.

2. Более плотная частица (т. е. обладающая малым парциальным удельным объемом) движется быстрее, чем менее плотная.

3. Чем больше плотность раствора, тем медленнее будут двигаться в нем частицы.

4. Чем больше коэффициент трения, тем медленнее движение частиц.

Эти четыре положения составляют основные правила седиментации и приложимы ко всем частицам независимо от того, являются ли они крупными структурами, макромолекулами или небольшими молекулами.

Поскольку скорость молекулы пропорциональна величине поля центробежной силы (т. е. $\omega^2 r$), обычно седиментационные свойства рассматриваются в зависимости от величины скорости, деленной на центробежное ускорение:

$$s = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{m(1 - \bar{v}\rho)}{f}, \qquad (2)$$

где s — *коэффициент седиментации.* Определение s является непосредственной задачей в большинстве экспериментов по скоростной седиментации (см. «Приложение»).

В идеале при одной и той же температуре значение s будет постоянным для частицы в данном растворителе. Однако в случае макромолекул это не так, вследствие их больших размеров, поэтому здесь теория должна быть дополнена. Эти дополнения следовало бы привести здесь же, однако они будут более понятными при рассмотрении реальных седиментационных данных, поэтому сначала рассмотрим оборудование для ультрацентрифугирования и виды получаемой информации.

Оборудование для ультрацентрифугирования

Эксперимент с центрифугированием требует приборов, которые позволяют работать при точно известных скоростях с малыми отклонениями без температурных колебаний *. Современные ультрацентрифуги работают при больших ускорениях до 420 000 ± 100 g с контролем температуры в пределах приблизительно 0,1°C. Существует два типа приборов — *аналитические* и *препаративные.* Аналитические центрифуги снабжены *оптической си-*

* Датой рождения метода ультрацентрифугирования считается 1923 г., когда Т. Сведберг разработал и построил первую ультрацентрифугу (см. список литературы в конце главы).

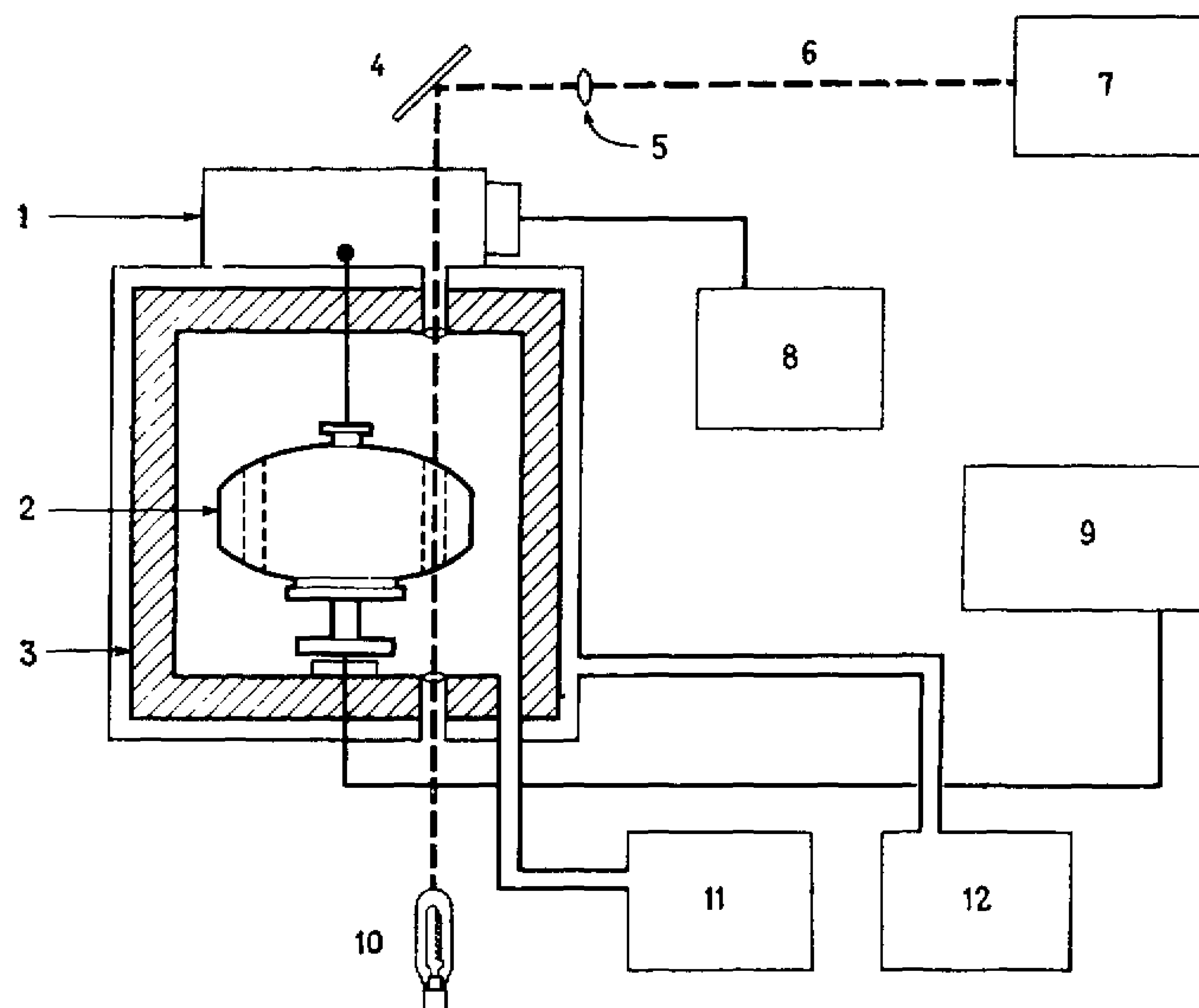


РИС. 11-1.

Аналитическая ультрацентрифуга фирмы Beckman.

Ротор находится в охлаждаемой камере в вакууме и подвешивается на струне, соединенной с ведущим валом мотора. В наконечнике ротора находится термисторный датчик температуры. Электрический контакт термистора с контрольным устройством осуществляется через сосуд с ртутью, с которой соприкасается наконечник ротора. Камера с ротором оборудована верхней и нижней линзами. Нижняя линза служит коллиматором, через нее в ячейку попадают параллельные лучи. Верхняя линза и камерная линза фокусируют проходящий свет на пленку. *1* — мотор; *2* — ротор; *3* — бронированная камера; *4* — зеркало; *5* — камерная линза; *6* — путь света; *7* — держатель пленки; *8* — панель контроля скорости; *9* — контроль температуры; *10* — источник света; *11* — вакуумный насос; *12* — охлаждение.

стемой, позволяющей определять распределение концентраций в любой момент времени в течение всего измерения, в то время как при использовании препаративных центрифуг требуется фракционирование содержимого центрифужной ячейки и измерение концентрации в каждой фракции для получения распределения концентраций. Название «препаративная центрифуга» употребляют не совсем правильно, так как, помимо использования для получения и очистки различных макромолекул и клеточных органелл, они почти столь же часто используются для количественного анализа смесей (т. е. как аналитический прибор).

На рис. 11-1 изображена схема аналитической ультрацентрифуги фирмы Beckman. Центрифуга имеет мотор, вращающий ротор. Ротор находится в защитной бронированной камере. Кроме того, имеется фотографическая система для регистрации распределения концентрации образца в ячейке центрифуги (подробное описание приведено в подписи к рисунку).

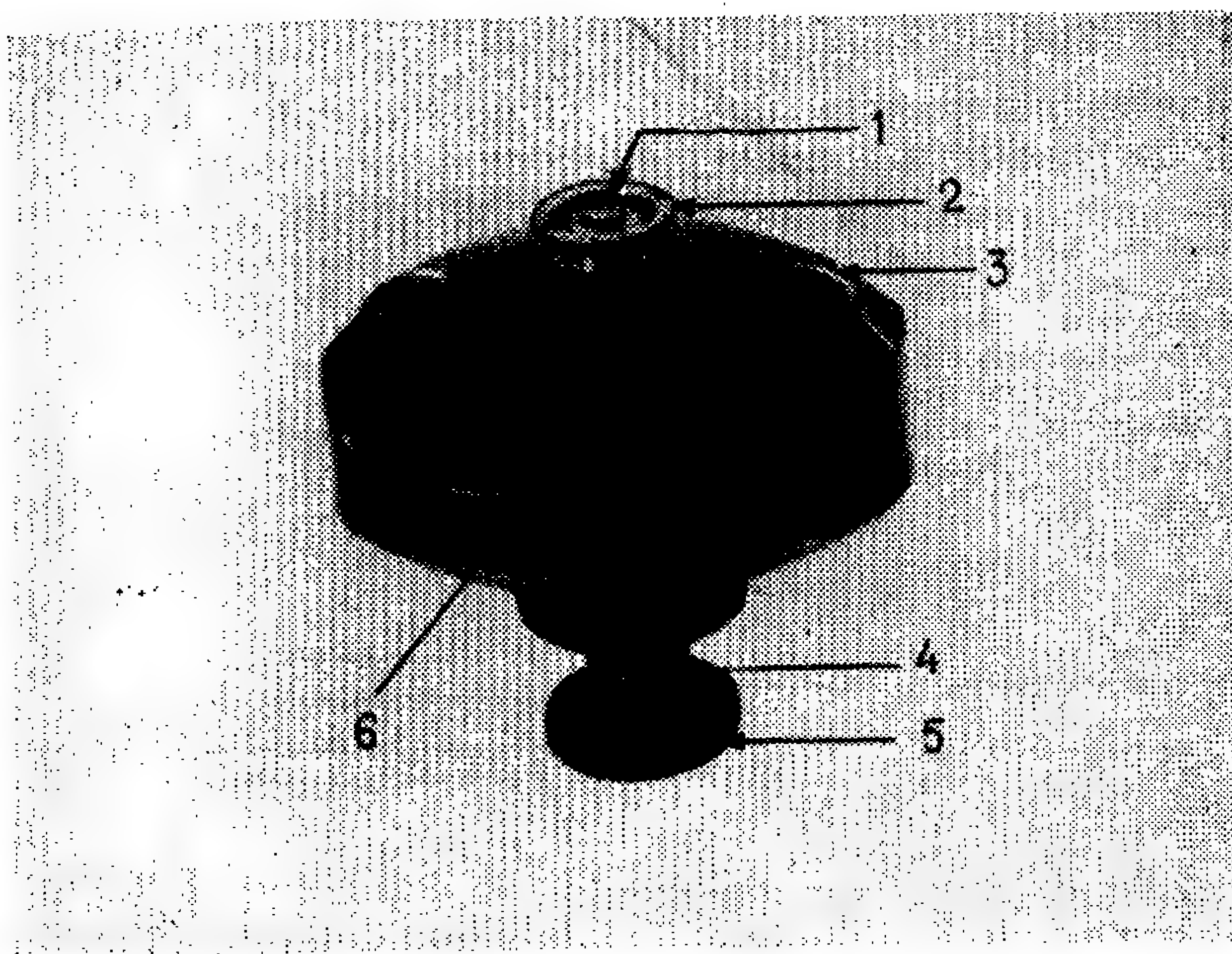
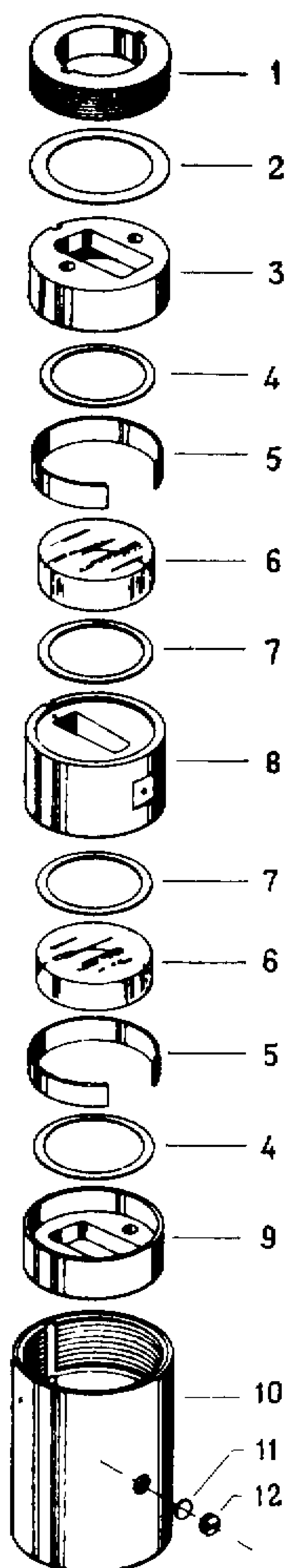


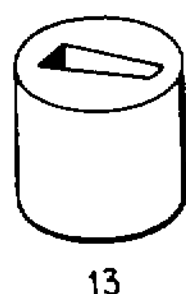
РИС. 11-2.

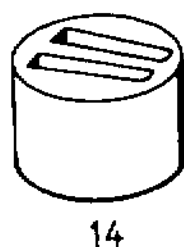
Аналитический ротор (с любезного разрешения Beckman Instruments).

1 — соединительная муфта; *2* — поддерживающее кольцо; *3* — отверстие для ячейки; *4* — термисторный датчик; *5* — подставка ротора; *6* — индексное отверстие.

Стандартный ротор для ультрацентрифуги фирмы Beckman показан на рис. 11-2. Ротор связан с электроприводом двигателя с помощью струны. В одном из отверстий ротора находится центрифужная ячейка, в другом — противовес. Кроме того, имеется индексное отверстие для определения расстояний от центра вращения. На рис. 11-3 показано устройство одного из простейших держателей образца — односекторной ячейки. Стенки ячейки сделаны таким образом, что при тщательной ориентации в роторе они параллельны силовым линиям центробежного поля. Это не дает материалу осаждаться на стенках. Ячейка состоит из сердечника, содержащего жидкий образец, двух окошек, корпуса, который держит сердечник и окошки, и отверстия для заполнения. Окошки обычно изготовлены из кварца, хотя в некоторых случаях для работы с очень большими скоростями их делают из сапфира, который меньше деформируется при больших нагрузках. Сердечник сделан из металла (обычно алюминия) или из пластика (Kel-F или эпоксидная смола). К достоинствам металлических сердечников следует отнести быстрое установление термического равновесия, что сводит к минимуму конвекцию, происходящую вследствие градиента температуры. С другой стороны, металл часто взаимодействует с растворителем или растворенным веществом; в таких случаях применяют сердечник из инертного пластика. Сердечник может быть выполнен и из титана, ко-







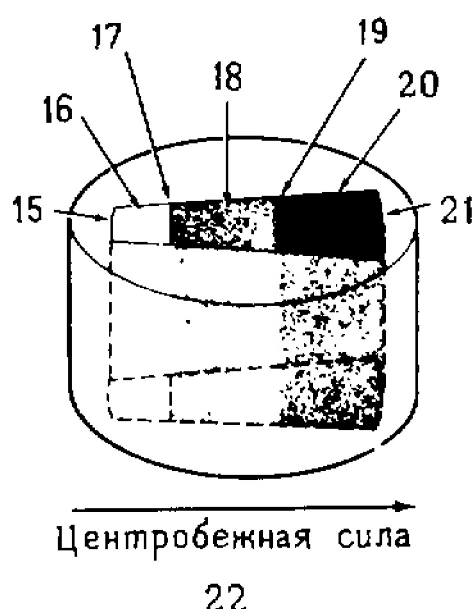


РИС. 11-3.

Ячейка центрифуги. Одно- и двухсекторный сердечники (с любезного разрешения Beckman Instruments).

1 — навинчивающееся кольцо; 2 — прокладка кольца; 3 — держатель верхнего окна; 4 — уплотнительная прокладка; 5 — гильза окна; 6 — окно; 7 — прокладка сердечника; 8 — алюминиевый сердечник; 9 — держатель нижнего окна; 10 — корпус ячейки; 11 — прокладка винта корпуса; 12 — винт корпуса; 13 — односекторный сердечник; 14 — двухсекторный сердечник; 15 — верх ячейки; 16 — воздух; 17 — мениск; 18 — растворитель; 19 — граница; 20 — раствор; 21 — дно ячейки; 22 — ячейка центрифуги.

торый обладает достоинствами обоих упомянутых выше материалов, однако при этом возможна работа только при относительно низких скоростях вследствие высокой плотности этого металла.

Для решения некоторых задач используют двухсекторную ячейку, один из секторов которой содержит раствор, а другой — растворитель, что позволяет получить базовую линию для оптической системы.

Распределение концентрации определяется путем пропускания через движущуюся ячейку света и регистрации интенсивности проходящего света либо на фотопленке, либо с помощью электронного сканирующего устройства. Электронное сканирующее

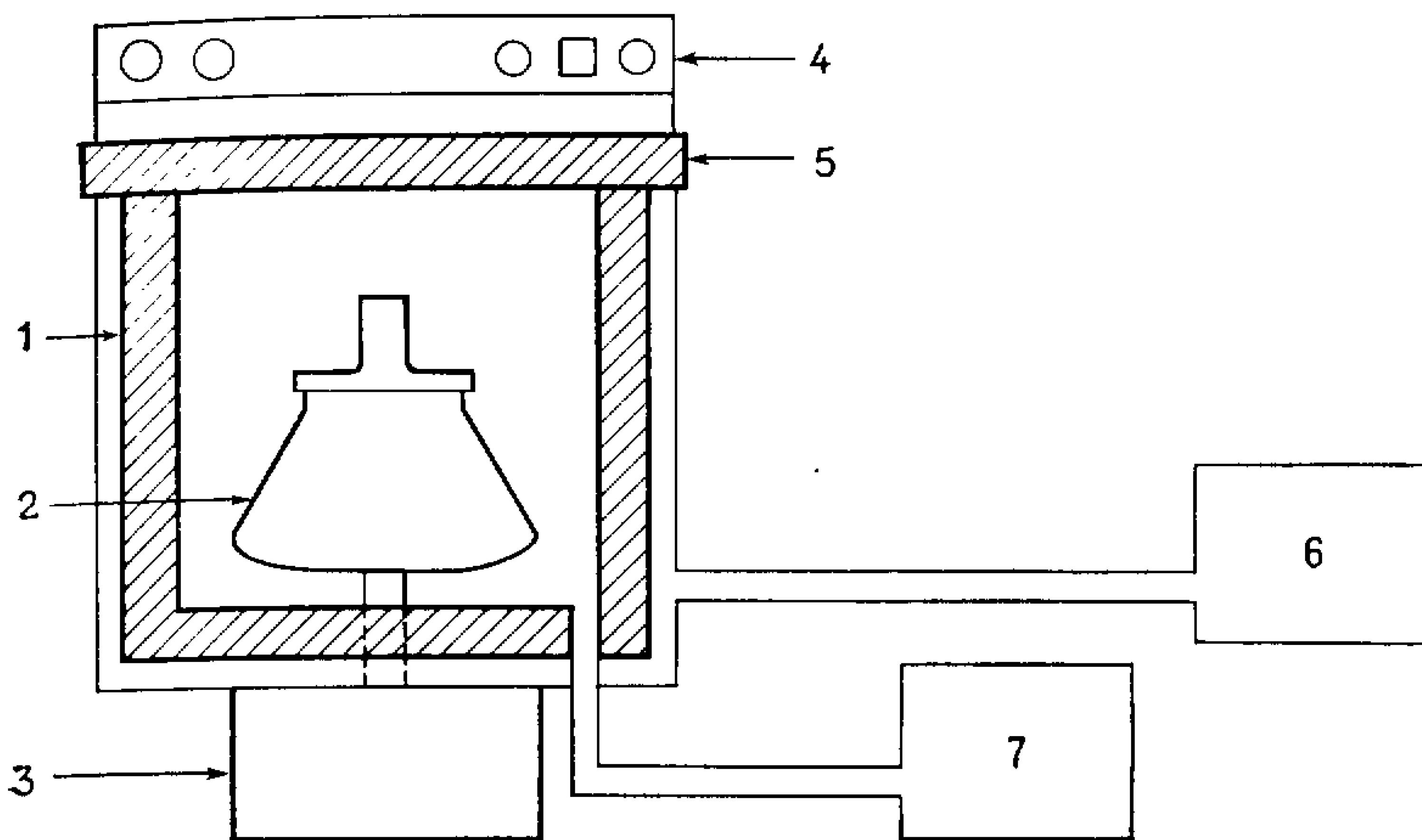


РИС. 11-4.

Препаративная ультрацентрифуга фирмы Beckman.

1 — бронированная камера; *2* — ротор; *3* — мотор; *4* — контрольная панель; *5* — отодвигающийся люк; *6* — охлаждение; *7* — вакуумный насос.

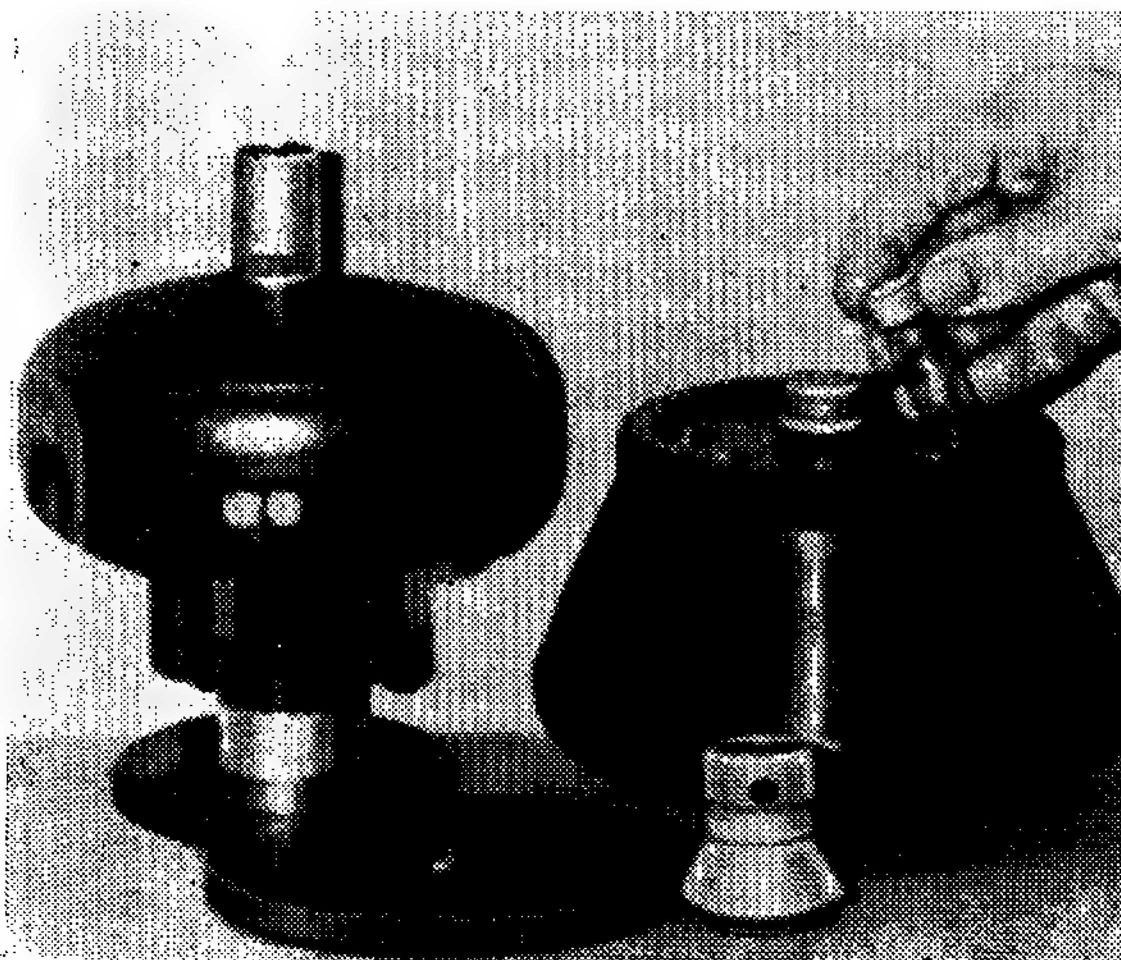


РИС. 11-5.

Ротор с подвесными стаканами (слева) и угловой ротор (справа) центрифуги фирмы Beckman. Эти роторы позволяют достигать ускорений 420 000 и 368 000 g соответствено при максимальной скорости 65 000 об/мин.

устройство хотя и стоит очень дорого, но позволяет получить точность, недостижимую при использовании фотографической системы.

На рис. 11-4 приведена схема препаративной ультрацентрифуги фирмы Beckman. Этот прибор более прост, чем аналитический.

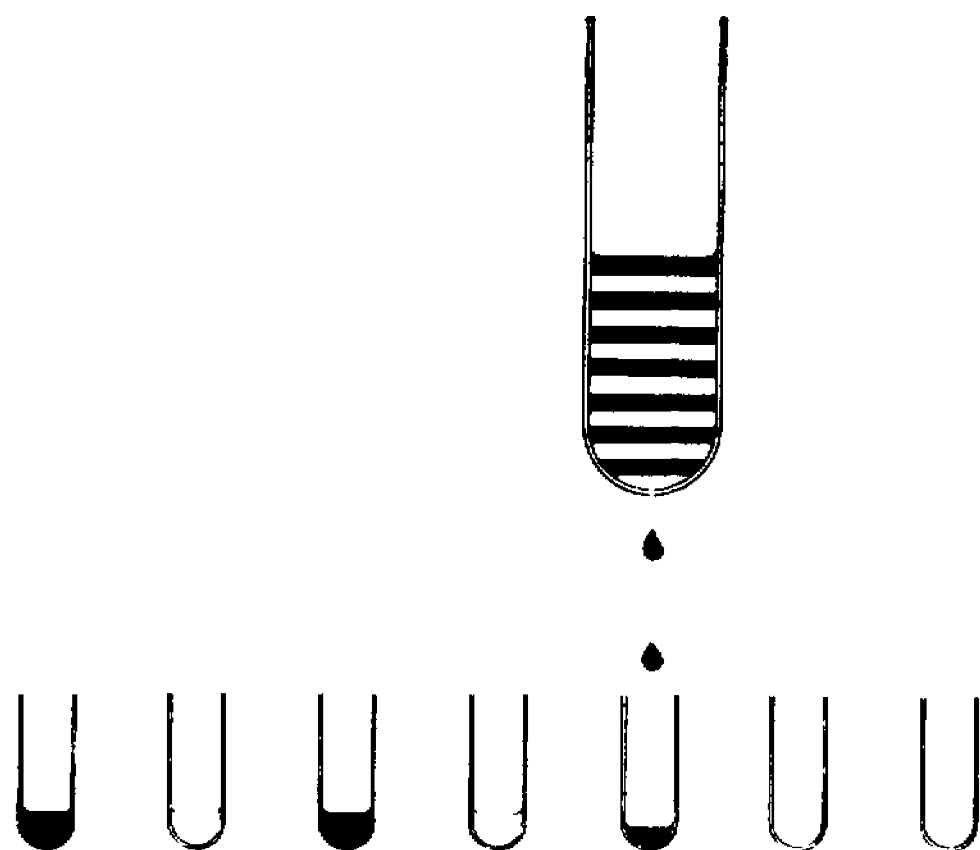


РИС. 11-6.

Капельное фракционирование содержимого центрифужной пробирки.

Дно пробирки прокалывают иглой. При условии отсутствия конвекции (т. е. при центрифугировании в градиенте плотности) капли соответствуют индивидуальным слоям жидкости. Схематически эти слои показаны в виде черных и светлых полос.

На рис. 11-5 показаны два типа роторов для препаративной ультрацентрифуги. Угловой ротор в первую очередь предназначен для осаждения материалов *. Он очень эффективен для этой цели, так как вещество проходит до стенки центрифужной пробирки короткое расстояние; накапливающийся на стенке материал быстро сползает по стенке на дно пробирки. Ротор с подвесными стаканами большей частью используют для аналитического равновесного и зонального центрифугирования (будет описано вкратце).

Если центрифугирование проводится для получения осадка, то после остановки вращения ротора пробирку вынимают и жидкий супернатант сливают с осадка. Если центрифугирование проводится в аналитических целях, то для фракционирования содержимого пробирки в дне пробирки прокалывают отверстие и собирают раствор по каплям. Если скорость течения при этом достаточно мала, чтобы не возникла турбулентность, каждая капля будет представлять собой единичный слой жидкости в пробирке, как показано на рис. 11-6.

Следует отметить, что стенки пробирок в препаративных роторах параллельны в отличие от ячейки секториальной формы, показанной на рис. 11-3. Это вызывает конвекцию и будет обсуждаться ниже в разделе, посвященном зональному центрифугированию. Однако до сих пор еще не разработан удовлетворительный препаративный ротор с пробирками секториальной формы.

* Здесь под осаждением понимается образование плотного осадка на дне центрифужной пробирки.

Распределение концентрации в эксперименте по скоростной седиментации в секторной ячейке

В седиментационных экспериментах существует два типа начальных условий. В одном частицы равномерно распределены в растворе. При седиментации частицы движутся через раствор, оставляя за собой зону чистого растворителя. Это носит название *скоростной седиментации,* в этом случае вся информация получается из параметров границы между растворителем и раствором. Другой тип, *зональная седиментация,* отличается тем, что образец наносится в виде слоя поверх более плотного растворителя. В этом разделе будет обсуждаться только скоростная седиментация.

На рис. 11-7 показано распределение концентрации в секторной ячейке центрифуги в случае различных растворов макромолекул после периода центрифугирования, достаточного для того, чтобы материал прошел приблизительно половину пути до дна ячейки *. Ячейка в серии *А* содержит материал с одним коэффициентом седиментации (в таких случаях обычно используют выражение «гомогенный по коэффициенту седиментации» или термин «монодисперсный»). Кроме того, он имеет низкий коэффициент диффузии, что приводит к четкой границе. В серии *Б* ячейка содержит смесь равных количеств двух компонентов, каждый из которых имеет собственный коэффициент седиментации и четкую границу, как в серии *А*. В серии *В* ячейка заполнена смесью компонентов, коэффициенты седиментации которых мало отличаются один от другого. Второй ряд представляет собой графики зависимости концентрации седиментирующих веществ в каждой ячейке от ее длины. Область изменения концентрации называется *границей,* верхняя ровная часть носит название *плато.* В третьем ряду приведены графики производных концентрационных кривых, т. е. *градиенты концентрации.*

Следует отметить, что 1) гомогенное вещество дает очень четкую границу, 2) смесь двух компонентов дает две четкие границы, похожие на ступени, 3) многокомпонентная смесь приводит к получению многоступенчатой границы, сливающейся в широкую плавную кривую, и 4) в каждом случае частицы осаждаются на дно ячейки.

Рассмотрим зависимость концентрации от расстояния более подробно на примере серии *Б*. Кривая имеет два параметра, поддающихся измерению: расстояние седиментации (из которого

* Автор имеет в виду седиментацию нативной ДНК.— *Прим. ред.*

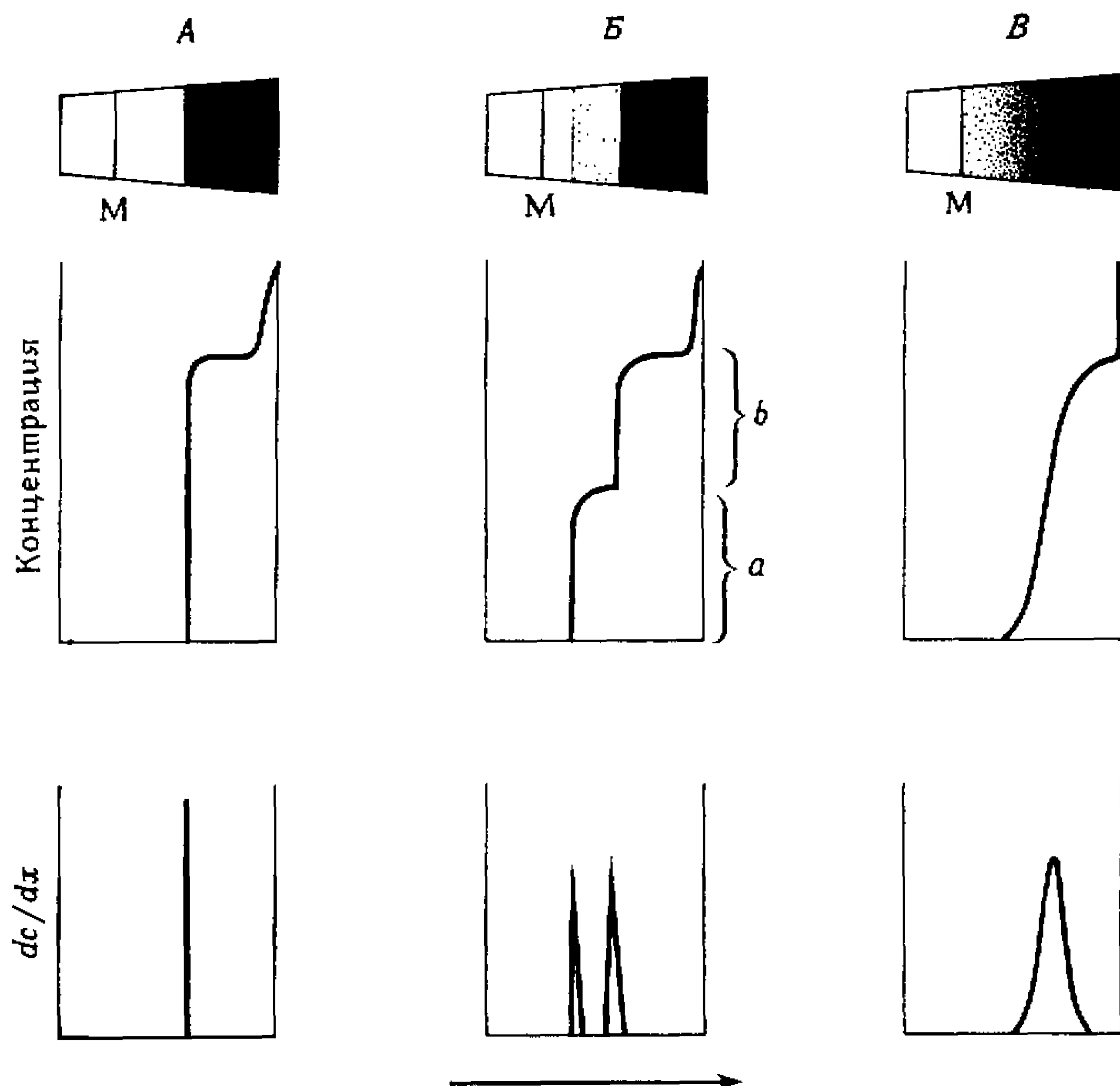


РИС. 11-7.

Распределение концентрации в ячейках, заполненных тремя различными растворами, через одинаковый промежуток времени.

А — в растворе содержится только один тип молекул с одним коэффициентом седиментации; *Б* — раствор содержит два компонента с различными коэффициентами седиментации; *В* — гетерогенная смесь с различными коэффициентами седиментации. Заметим, что вещество накапливается на дне ячейки. Нижний ряд показывает градиент концентрации; эти графики эквивалентны фотографиям, полученным с помощью шлиреновской оптики. Буквой *М* обозначен мениск.

определяется s) и относительную высоту двух границ. Поскольку концентрации аддитивны, высоты a и b соответствуют соотношению двух компонентов. Ясно, что если два компонента присутствуют в равных количествах, то $a=b$ * в случае, когда эти вещества осаждаются независимо. В общем случае, если медленнее идущий материал a представляет собой часть (f) массы всего материала, то $f=a/(a+b)$. Теперь вернемся к многокомпонентной системе. Если в ней присутствует три компонента, то получится граница, показанная на рис. 11-8, *А*. В общем случае, если смесь состоит из гетерогенной части с массовой долей f и быстроосаждаемого компонента, количество которого определяется как $(1-f)$, будет получаться картина, изображенная на рис. 11-8, *Б*,

* Все это справедливо, когда оба компонента имеют одинаковые коэффициенты экстинкции. — *Прим. ред.*

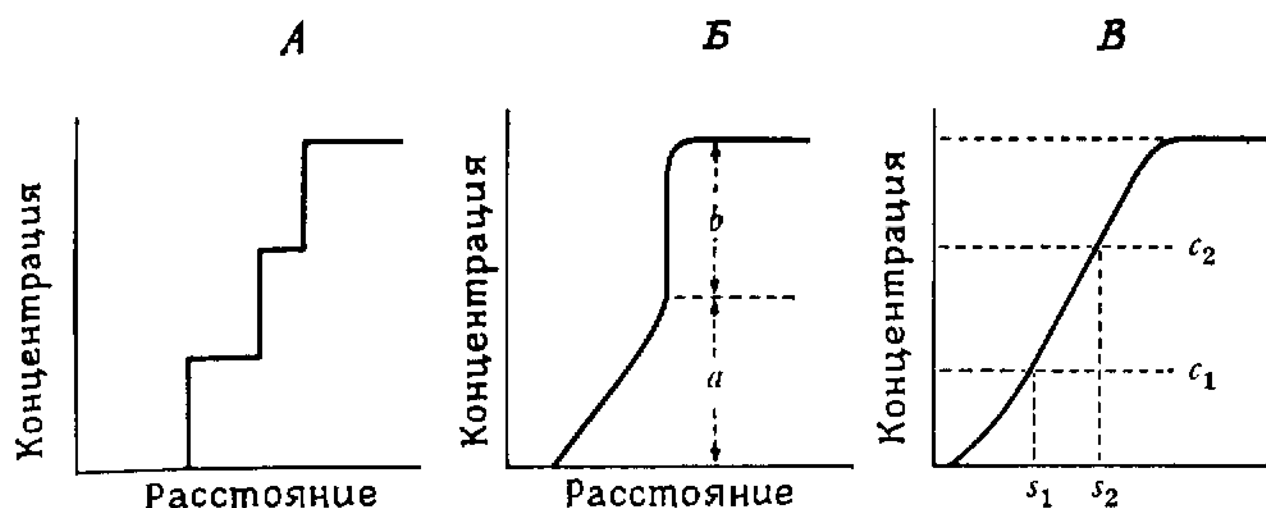


РИС. 11-8.

Определение состава раствора методом скоростной седиментации.

А — раствор содержит три компонента в равных концентрациях; *Б* — раствор содержит главную фракцию, обладающую единственным значением s, остальное вещество движется медленнее и представляет собой гетерогенную смесь; $a/(a+b)$ — доля гетерогенного вещества, а $b/(a+b)$ — доля гомогенной фракции; *В* — раствор содержит несколько компонентов; c_1 и c_2 — концентрации вещества со значениями s меньшими или равными s_1 и s_2 соответственно, а $(c_2 - c_1)$ — концентрация вещества с $s_1 < s < s_2$.

для которой справедливо соотношение $a/(a+b) = f$. Поскольку зависимость концентрации от расстояния легко преобразовать в зависимость концентрации от коэффициента седиментации, массовая доля материала с s, лежащим между s_1 и s_2, составит $(c_2 - c_1)/c$, как показано на рис. 11-8, *В*.

Эти же рассуждения справедливы и для зависимостей градиентов концентраций, показанных на рис. 11-7, однако в этом случае следует измерять площади, а не расстояния.

Приведенный ниже пример показывает, как такие простые измерения могут дать значительную информацию о реальной молекуле.

Пример 11-А. *Структура ДНК фага Т7 E. coli.* ДНК бактериофага Т7 *E. coli* дает границу, изображенную на рис. 11-9, *А*. Эта ДНК дает одну четкую границу при всех исследованных концентрациях, так что ее можно считать гомогенной с точки зрения молекулярной массы. Если ДНК центрифугировать при pH 12,5, когда происходит разделение двух цепей, получается граница, показанная на рис. 11-9, *Б*, которая состоит из двух частей — четкой (гомогенной) и широкой (гетерогенной). Расстояние $a/(a+b)$ равно 0,5; это означает, что 50% одиночных цепей ДНК осаждается медленнее, чем гомогенный компонент. Отсюда можно заключить (поскольку в этом случае известно, что меньший коэффициент седиментации соответствует меньшей молекулярной массе), что 50% одиночных цепей ДНК должно быть расщеплено. Так как более медленно движущийся материал осаждается достаточно гетерогенно, расщепленные цепи имеют различный размер, и поэтому разрывы могут происходить в разнообразных местах молекулы, скорее всего со случайным распределением.

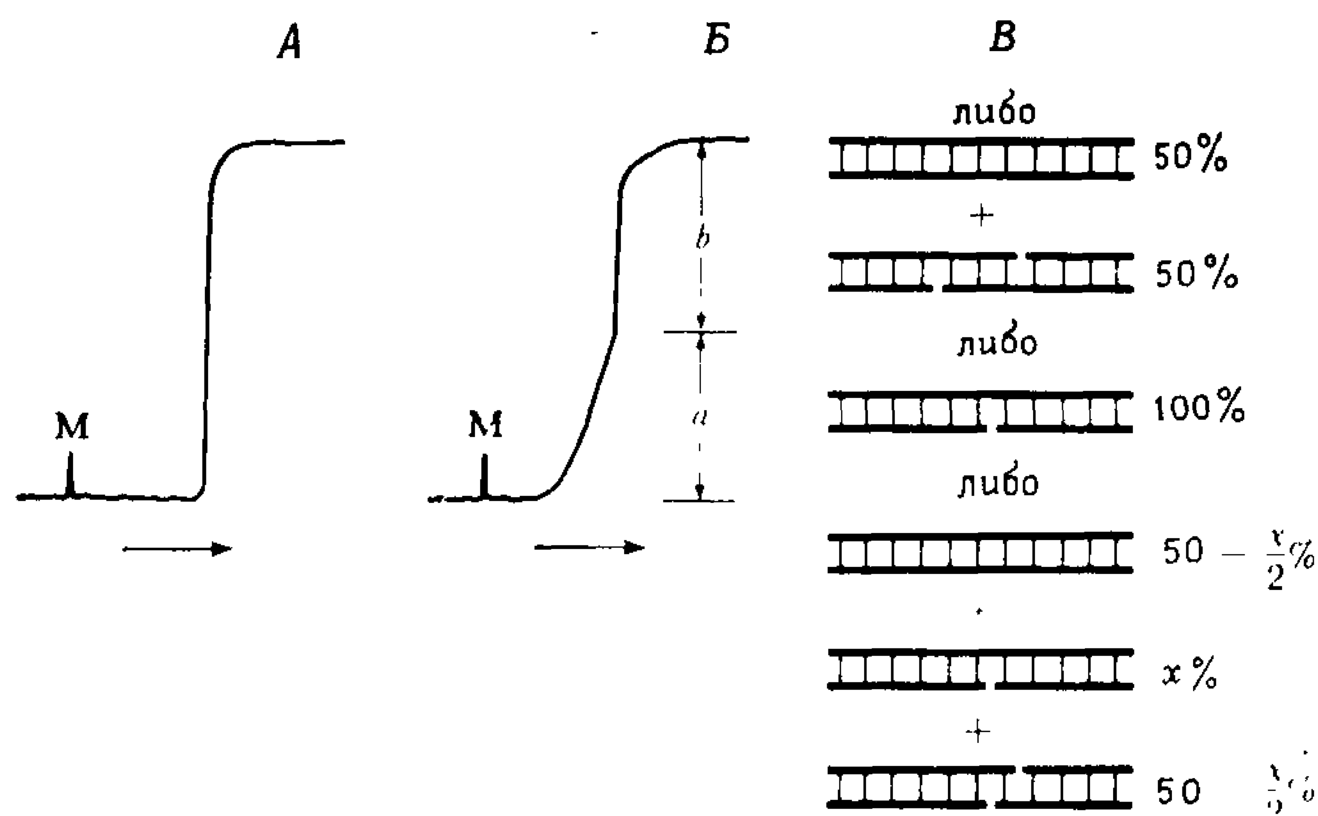


РИС. 11-9.

Седиментационный анализ ДНК фага 17 *E. coli*.

Буквой М обозначен мениск, а стрелками — направление седиментации. *А* — нативная ДНК дает одну резкую границу, показывающую, что молекулы не расщеплены. *Б* — седиментация в щелочи, при которой происходит разделение цепей, показывающая, что некоторые единичные цепи являются интактными (*a*), а некоторые содержат разрывы (*b*). Поскольку $a=b$, концентрация интактных молекул равна концентрации молекул с разрывами. Число разорванных молекул, естественно, больше, чем интактных. *В* — три возможные интерпретации полученных результатов.

Поскольку расщеплена половина одиночных цепей, то либо все молекулы в популяции двухцепочечной ДНК содержат разрыв в одной из цепей, либо половина двухцепочечных молекул не содержит разрывов, тогда как другая половина имеет разрывы в обеих цепях, либо здесь присутствует смесь цепей без разрывов, с одним и с двумя разрывами (рис. 11-9, *Б*). Полученные данные одни не позволяют различить эти предположительные возможности.

Измерение распределения концентрации в аналитической ячейке

Во всех методах анализа распределения молекул при ультрацентрифугировании существует необходимость измерения концентраций компонентов. В существующих ультрацентрифугах для этого используются три различные оптические системы: *шлиреновская, интерференционная* и *абсорбционная* (обычно по ультрафиолетовому поглощению). Вряд ли здесь нужно детально рассматривать, каким образом эти оптические системы дают изображение, из которого получают концентрацию (это можно найти

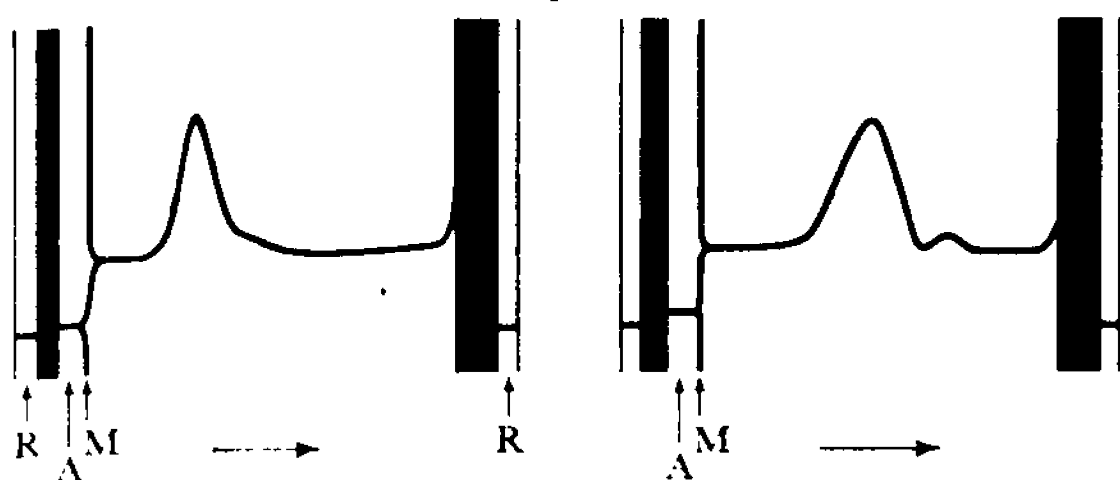


РИС. 11-10.

Шлирен-седиментограммы смеси двух белков.

Правая седиментограмма соответствует большему времени центрифугирования. Обратите внимание, что при большем времени отделяется небольшое количество более быстро движущегося вещества. Черные полосы соответствуют верху и дну ячейки. А — воздушное пространство над раствором в ячейке; R — индексные отверстия в контрбалансе, которые находятся на фиксированном расстоянии от оси вращения; М — мениск.

в описаниях к приборам), однако следует обсудить, каким образом изображение связано с распределением концентрации в ячейке центрифуги.

Шлиреновская система использует тот факт, что луч света не претерпевает отклонения при прохождении через область с однородной концентрацией, но отклоняется, проходя через участок с изменяющейся концентрацией, вследствие изменения показателя преломления, значение которого зависит от концентрации. Оптическая система в современных центрифугах преобразует это отклонение в кривую, показывающую градиент концентрации (рис. 11-10) *. Оптическую систему можно отъюстировать таким образом, что кривая будет более или менее четкой; однако в процессе юстировки площадь, ограниченная шлиреновской кривой и базальной линией, должна быть постоянной и пропорциональной концентрации. Концентрацию при этом можно определить путем измерения этой площади и использования определенных оптических констант данного прибора. При уменьшении концентрации вещества в ячейке площадь уменьшается также и может достичь такого предела, когда пик практически сольется с базальной линией; реальный нижний предел чувствительности шлиреновской оптики составляет концентрация порядка нескольких миллиграммов на 1 мл. Ценность шлиреновской системы заключается в возможности определения формы границы и установления присутст-

---

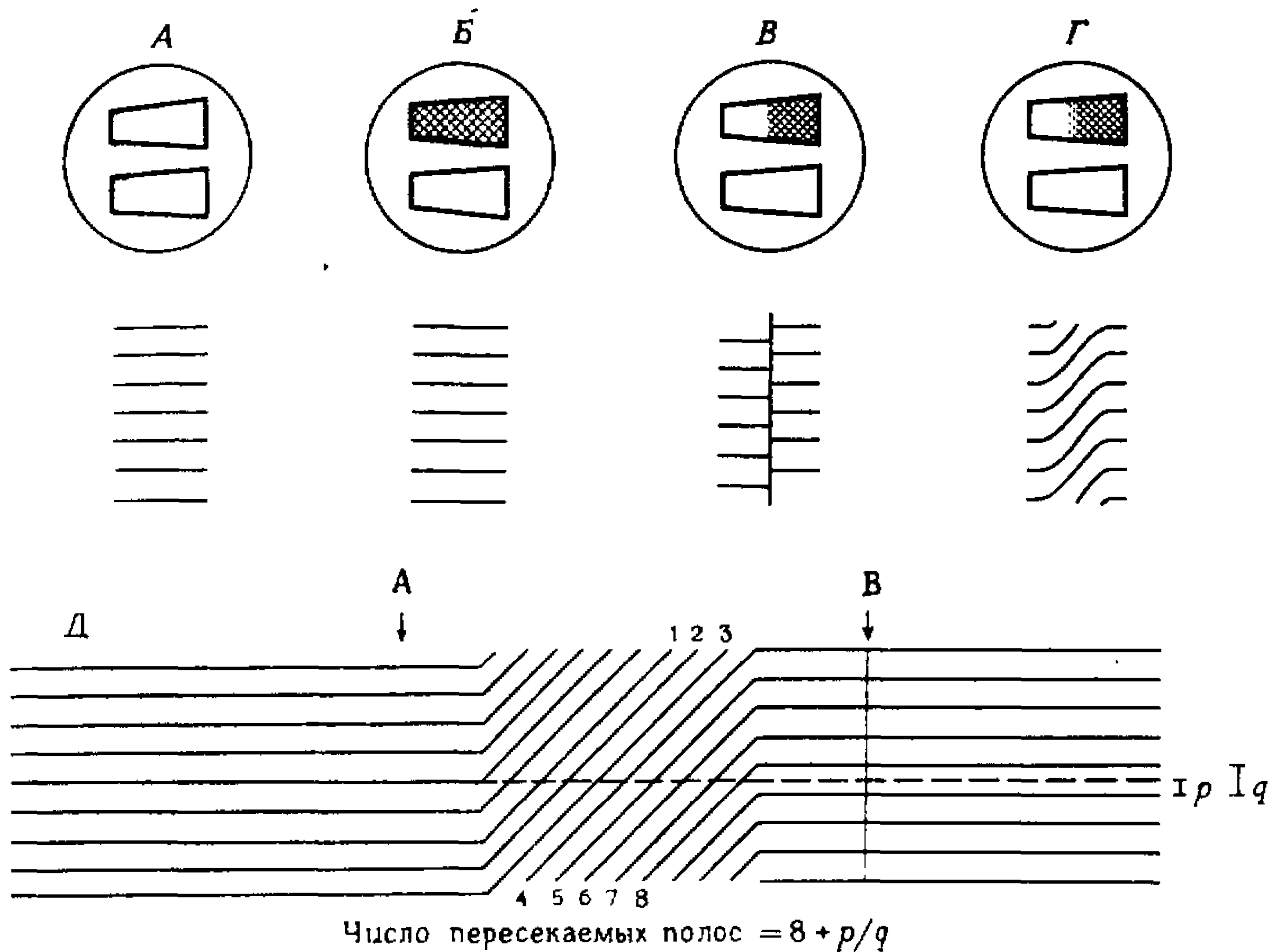
* Изобретение этой простой оптической системы, которая на самом деле дает график зависимости градиента концентрации от расстояния, было главным достижением в разработке метода ультрацентрифугирования, без которого эта техника, возможно, никогда не стала бы столь полезной. Систему разработал Дж. Ст. Л. Филпот и модифицировал Х. Свенсон.

вия негомогенности в *s*. Эта система широко используется, особенно для определения коэффициентов седиментации белков *.

Для некоторых методик (особенно равновесия и приближения к равновесию) шлиреновская система недостаточно чувствительна для определения малых изменений концентрации. Для решения этих задач была разработана *интерференционная система*, в которой используется двухсекторная ячейка (рис. 11-3), один из секторов которой содержит только растворитель, а другой — раствор. При прохождении света через оба сектора получается оптическая интерференционная картина. (Механизм образования интерференционной картины описан в литературе, список которой приведен в конце главы. Здесь же достаточно будет сказать, что в основе оптической системы лежит интерферометр Рэлея, причем положение интерференционных полос является функцией показателя преломления в каждой точке ячейки. В то время как шлиреновская система дает зависимость *градиента* показателя преломления от расстояния вдоль ячейки, в случае интерференционной оптики каждая интерференционная полоса является кривой зависимости показателя преломления от расстояния.)

На рис. 11-11 изображены интерференционные картины, получаемые в различных ситуациях. В части *А* оба сектора заполнены только растворителем, поэтому полосы вдоль всей ячейки оказываются неотклоненными. В части *Б* один сектор содержит растворенное вещество, и полосы действительно отклоняются на расстояние, пропорциональное концентрации, хотя это и трудно обнаружить, поскольку все индивидуальные полосы выглядят одинаково. Если изучаемый материал гомогенен и имеет малый коэффициент диффузии, так что граница будет узкой (как на рис. 11-7), получается картина, показанная в части *В*, где полосы сдвинуты вверх. В реальном случае граница имеет конечную ширину, в результате чего получается картина, изображенная в части *Г*. Часть *Д* показывает принцип определения концентрации по сдвигу полос; для этого продолжают линию от полосы около центра картины через картину вдоль ячейки и подсчитывают число пересеченных полос слева направо от точки отсчета А по направлению к дну ячейки. Как только продолжение линии не будет пересекаться с другими полосами, выбирают точку В, из которой проводят перпендикуляр, как показано на рисунке. Затем

* Как будет видно в дальнейшем, при использовании шлиреновской оптики требуемая концентрация бывает настолько высока, что имеет место сильная концентрационная зависимость. Это не мешает при работе с белками, однако дает сильный эффект в случае нуклеиновых кислот (см. рис. 11-13). О седиментационных свойствах ДНК не было почти ничего известно, пока не разработали более чувствительную УФ-абсорбционную оптическую систему.



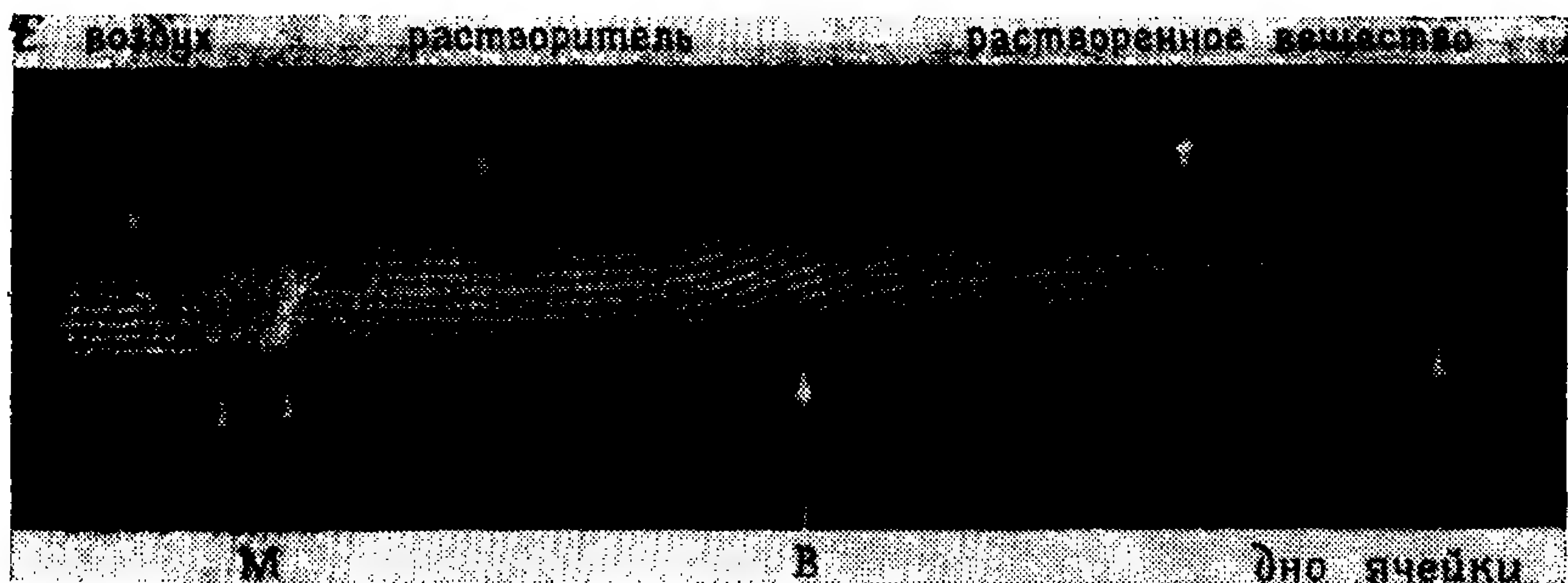
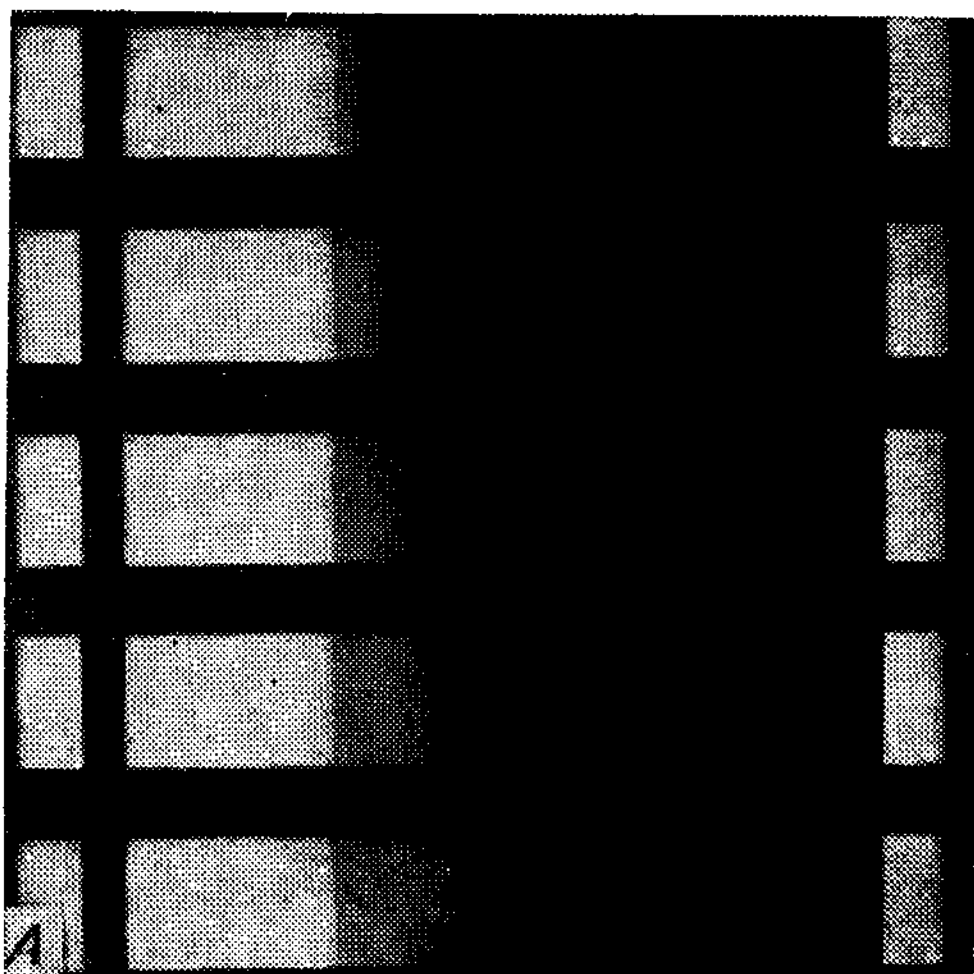


РИС. 11-11.

Получение и анализ седиментограмм с помощью интерференционной оптики в двухсекторной ячейке.

А — интерференционная картина, соответствующая одинаковым растворам в обеих секторах. *Б* — один сектор содержит раствор, а другой — растворитель (до начала центрифугирования). *В* — то же, что и в части *Б*, но через некоторое время после начала центрифугирования (образец гомогенен и имеет очень малый коэффициент диффузии). *Г* — то же, что и в части *В*, но раствор содержит вещество с очень высоким коэффициентом диффузии. *Д* — метод подсчета числа пересекающихся полос (см. текст). *Е* — седиментация бычьего сывороточного альбумина в H_2O при 60 000 об/мин в течение 1 ч; фотография получена при помощи интерференционной оптики. Седиментация идет слева направо. Использована двухсекторная ячейка, один из секторов которой заполнен растворителем, а другой — раствором. Фотография получена для различных объемов жидкости в секторах, поэтому на ней можно видеть два мениска (М). Границе (В) соответствует искривление полос. Заметим, что полосы искривляются вверх по направлению к дну ячейки, так как вещество в процессе седиментации осаждается. Поскольку положение полос определяется концентрацией растворенного вещества, можно построить график зависимости концентрации вдоль ячейки.



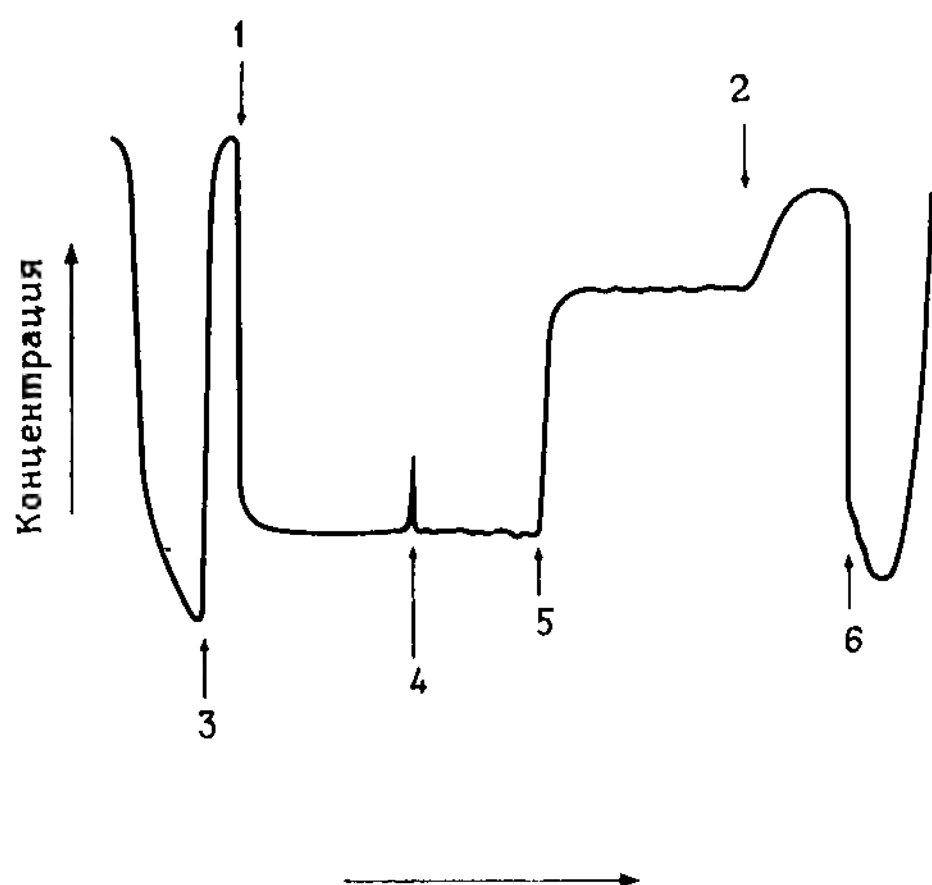


РИС. 11-12.

А — седиментограмма ДНК фага *E. coli*, полученная с применением системы регистрации по УФ-поглощению. Седиментация проходит слева направо. Обратите внимание, что на рисунке приведен позитивный отпечаток, тогда как в тексте говорится о негативном. *Б* — график, полученный при фотометрировании степени почернения второго кадра в части *А*.

1 — верх ячейки; *2* — дно ячейки; *3* — внутренняя индексная грань; *4* — мениск; *5* — граница; *6* — наружная индексная грань.

измеряют расстояния p и q. Отсюда относительная полоса равна p/q. Изменение показателя преломления (Δn) при движении вдоль оси ячейки от левой стороны границы, где концентрация равна нулю, к точке В равно

$$\Delta n = \Delta\mathcal{F}\lambda/d, \qquad (3)$$

где $\Delta\mathcal{F}$ — число пересеченных полос; λ — длина волны света, использованного для получения полос; d — длина ячейки вдоль пути, проходимого светом (не путать с расстоянием в направлении

центрифугирования). Поскольку отношение между n и концентрацией белка точно известно (его легко можно измерить для любого вещества с помощью рефрактометра), можно с большой точностью построить график зависимости концентрации от расстояния в ячейке (или изменения концентрации в области границы). (Отсюда можно получить форму границы, что дает возможность определить значение s.) Интерференционная система используется при концентрациях до нескольких сот микрограммов на 1 мл, примерно на один порядок меньших, чем в случае шлиреновской оптики.

Для нуклеиновых кислот зависимость s от концентрации настолько велика, что искали метод, позволяющий использовать концентрации менее 20 мкг/мл. Здесь на помощь приходит то обстоятельство, что молярный коэффициент поглощения (гл. 14) нуклеиновой кислоты при 253,7 нм (сильная линия в излучении ртутной лампы, применяемой в качестве источника света) очень велик. В связи с этим была разработана абсорбционная оптическая система. Вернемся к рис. 11-7, где изображено распределение концентрации вдоль ячейки. Если ячейку фотографировать в ультрафиолетовом свете, то степень почернения пленки будет уменьшаться с увеличением концентрации нуклеиновой кислоты. На рис. 11-12, *А* приведена типичная фотография седиментирующей ДНК. Если пленку после этого промерить с помощью фотометра, легко можно получить зависимость концентрации от расстояния (рис. 11-12, *Б*). В настоящее время пользуются разнообразными приборами, позволяющими обойтись без фотографирования, которые способны прямо измерять количество проходящего света и преобразовывать его с помощью фотоэлементов и соответствующих электронных устройств в зависимость концентрации от расстояния, изображаемую графически самописцем. Такие приборы называются сканирующими устройствами.

Некоторые аналитические ультрацентрифуги оборудованы теперь монохроматорами для выбора длины волны, что позволяет зарегистрировать молекулы с помощью абсорбционной оптики с использованием длины волны, соответствующей максимуму поглощения. Это дает возможность работать при значительно более низких концентрациях белка в тех случаях, когда белок обладает сильным поглощением (например, цитохром *с* или гемоглобин).

Факторы, влияющие на скорость седиментации

Прежде чем обсуждать сложные проблемы скорости седиментации, попробуем их представить себе на простых примерах. Предположим, что вы идете через комнату. Затем предположим, что вы пересекаете бассейн, причем вода доходит вам до шеи, а потом через такой же бассейн, но с патокой. Отсюда становится ясным, какое влияние на вашу скорость будет оказывать растворитель. Теперь представим, что вы пересекаете бассейн с раскинутыми в стороны руками. При этом ваш коэффициент трения возрастает, поэтому для перехода бассейна потребуется большее время, как следует из уравнения (1). Если в таком бассейне одновременно находится 100 человек, то вперед двигаться будет труднее, а с раскинутыми руками — еще труднее. Отсюда должно быть понятно, почему значение s становится меньше при высоких концентрациях, причем концентрационная зависимость больше для сильно асимметричных молекул. Предположим, что вы стараетесь бежать в воде с не полностью раскинутыми в стороны руками. Если вы при этом потратите в 2 раза больше энергии, то значит ли это, что для пересечения бассейна понадобится вдвое меньшее время? Теперь вы можете представить зависимость скорости. Позже вы увидите, что хотя интуиция подсказывает направление эффектов, на молекулярном уровне они могут отличаться от получающихся в бассейне.

Коэффициент седиментации макромолекул зависит от ряда факторов, что связано с 1) зависимостью формы молекул от состава растворителя, 2) наличием у многих молекул зарядов, 3) их большим размером в сравнении с размерами молекул растворителя и 4) деформациями макромолекул при движении. Результатом этих эффектов является зависимость s от концентрации, скорости центрифугирования и ионной силы растворителя.

Зависимость s от концентрации

Рассмотрим раствор макромолекул такого размера, что они часто сталкиваются друг с другом. Это характерно для очень больших или вытянутых молекул (таких, как белки и нуклеиновые кислоты), поскольку при их вращении в растворе они эффективно занимают относительно большой объем раствора. При приближении одной такой макромолекулы к другой молекулы растворителя движутся в противоположном направлении с бóльшими трудностями, т. е. вязкость растворителя вблизи макромолекул заметно увеличивается. Результатом этого является уменьшение скорости движения частицы под действием центробежной силы и

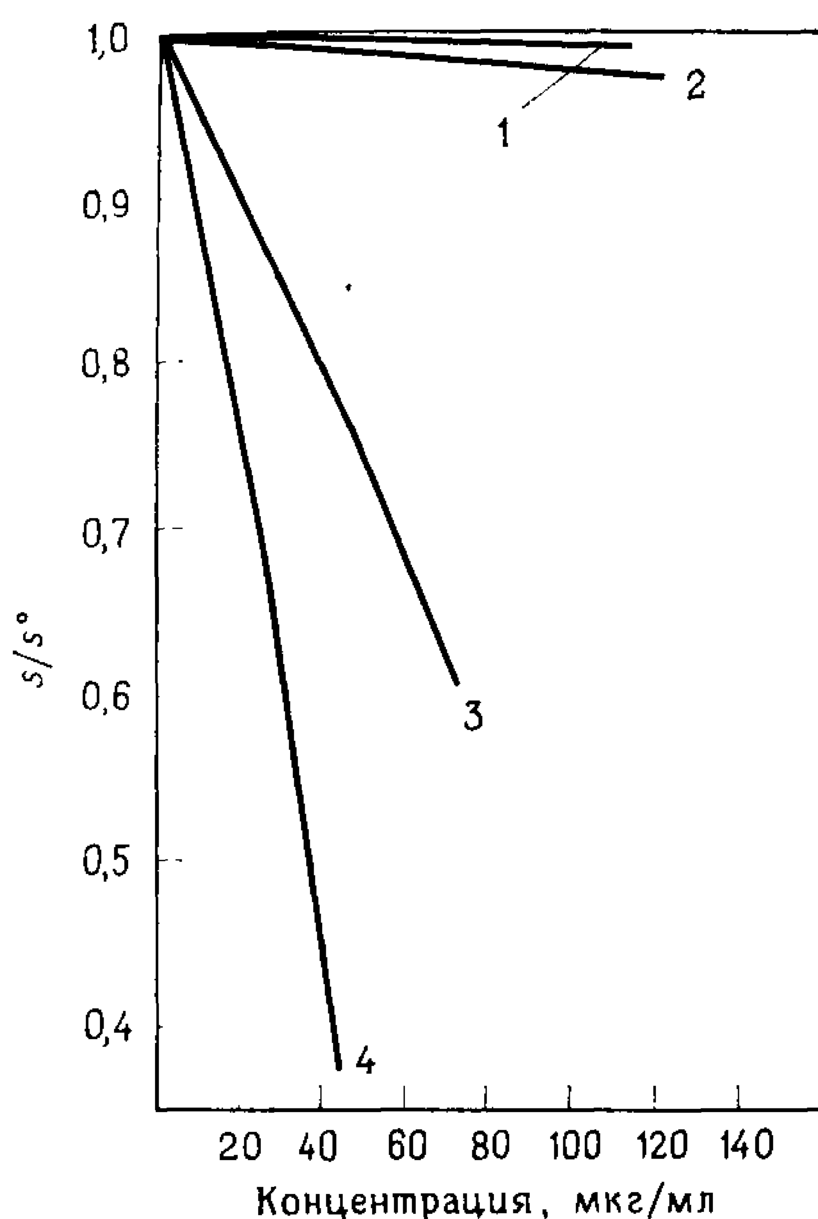


РИС. 11-13.

Концентрационная зависимость s, выраженная функцией s/s^0 от концентрации, где s^0 — значение s, экстраполированное к нулевой концентрации. Обратите внимание, что концентрационная зависимость становится более сильной в случае увеличения молекулярной массы и более вытянутых молекул.

1 — небольшие глобулярные молекулы белка; *2* — фаг $\varnothing$ X174; *3* — ДНК фага Т7; *4* — ДНК фага Т6.

поэтому уменьшение s. Так как вероятность столкновения (или сближения) возрастает с увеличением как молекулярного объема, так и протяженности молекулы, степень зависимости от концентрации также возрастает с ростом этих параметров. Это показано на рис. 11-13, где изображены некоторые характерные кривые зависимости s от концентрации ДНК или белка. Как видно, наибольшая зависимость имеет место в случае больших вытянутых молекул (т. е. ДНК), тогда как для небольших сфер (фагϕ X174) и глобулярных белков она невелика *.

До сих пор не существует детального теоретического описания концентрационной зависимости **. Однако эмпирическим путем найдено, что для большинства систем концентрационная зависимость лучше всего описывается уравнением

$$s(c) = s^0/(1 + kc)$$

* Невелика еще не означает, что несущественна. Например, белки обычно изучают при таких высоких концентрациях (порядка 0,5—5,0 мг/мл), что *общее* уменьшение S может быть значительным.

** Была сделана попытка улучшить уравнение (4). Например, было рассчитано, что $s(c) = s°(1 + k[\eta]c)$, где $[\eta]$ — характеристическая вязкость (гл. 13), а k — константа, имеющая значение 1,2 для стержнеобразных молекул и 1,6 для сферических. Однако и эта теория остается полуэмпирической, так как значение $[\eta]$ для большинства белков и полинуклеотидов не поддается простому расчету.

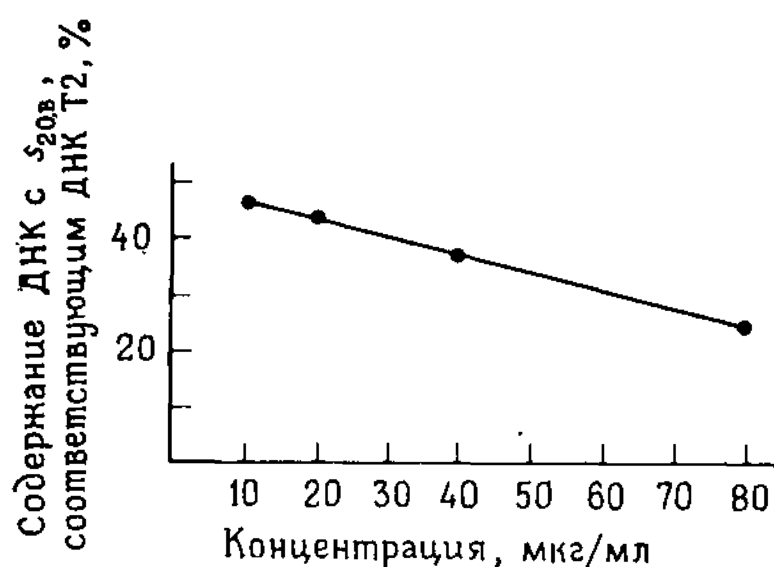


РИС. 11-14.

Количество ДНК фага Т2, получаемое по данным седиментационного анализа смеси ДНК фагов Т2 и Т7 (1 : 1) при различных концентрациях ДНК (эффект Джонстона—Огстона).

или

$$\frac{1}{s(c)} = \frac{1}{s^0} + \frac{kc}{s^0}, \tag{4}$$

где s^0 — s при концентрации, равной нулю, $s(c)$ — s при концентрации c, а k — константа для данной молекулы. Значение s^0 получают экспериментально путем измерения s при различных концентрациях, построения зависимости $1/s$ от c и установления значения $1/s^0$ экстраполяцией до $c=0$. Очевидно, что s^0 является наиболее полезным параметром, описывающим молекулу, поэтому его следует определять во всех случаях. В публикуемых работах это делается не всегда, поэтому важно иметь в виду, что между s^0 и s, измеренным при стандартных концентрациях, могут быть существенные различия, что следует из рис. 11-13.

В случае смеси макромолекул с различными значениями s при относительно высокой концентрации возникает особая проблема. В этом случае молекулы мешают седиментации не только себе подобных, но и других типов молекул. К тому же молекула с бóльшим s и большей концентрационной зависимостью, должна седиментировать через раствор более медленно движущихся молекул. При высокой концентрации более быстро осаждаемые молекулы будут так задерживаться, что они седиментируют почти с той же скоростью, что и более медленно осаждаемые молекулы; при этом может происходить «маскировка» того факта, что в действительности имеется смесь, и можно получить ошибочную информацию о гомогенности материала. Этот процесс носит название эффекта Джонстона — Огстона. На деле для разделения больших молекул нуклеиновых кислот часто приходится работать с очень низкими концентрациями, поскольку только в этих условиях происходит разделение двух компонентов. Однако даже при этих концентрациях полученные данные показывают меньшее содержание более быстро осаждаемого компонента, чем имеется в действительности. Пример этого дан на рис. 11-14. Как будет показано ниже (см. разд. «Зональное центрифугирование в предварительно подготовленном градиенте плотности»), эта трудность сводится к минимуму при использовании метода зонального центрифугирования.

Зависимость седиментации от скорости

Зависимость седиментации от скорости включает два независимых явления — зависящую от скорости агрегацию молекул, которая проявляется при высоких концентрациях, и фактическое понижение s^0 при высокой скорости. Оба этих явления до конца еще не понятны, однако работы Бруно Зимма и его сотрудников позволяют высказать некоторые соображения по поводу каждого из них.

Зависящая от скорости агрегация выражается в кажущейся потере вещества из массы раствора, что приводит к понижению эффективной концентрации макромолекул (и поэтому к увеличению кажущегося значения s). Обычно это явление объясняют тем, что при большой скорости молекулы оставляют после себя след (подобный кильватерной струе, образующейся при движении корабля), который увеличивает скорость молекулы непосредственно позади нее. Это приводит к образованию агрегатов молекул, обладающих очень высоким значением s и быстро образующих осадок на дне центрифужной пробирки. Такой процесс продолжается до тех пор, пока концентрация не понизится на-

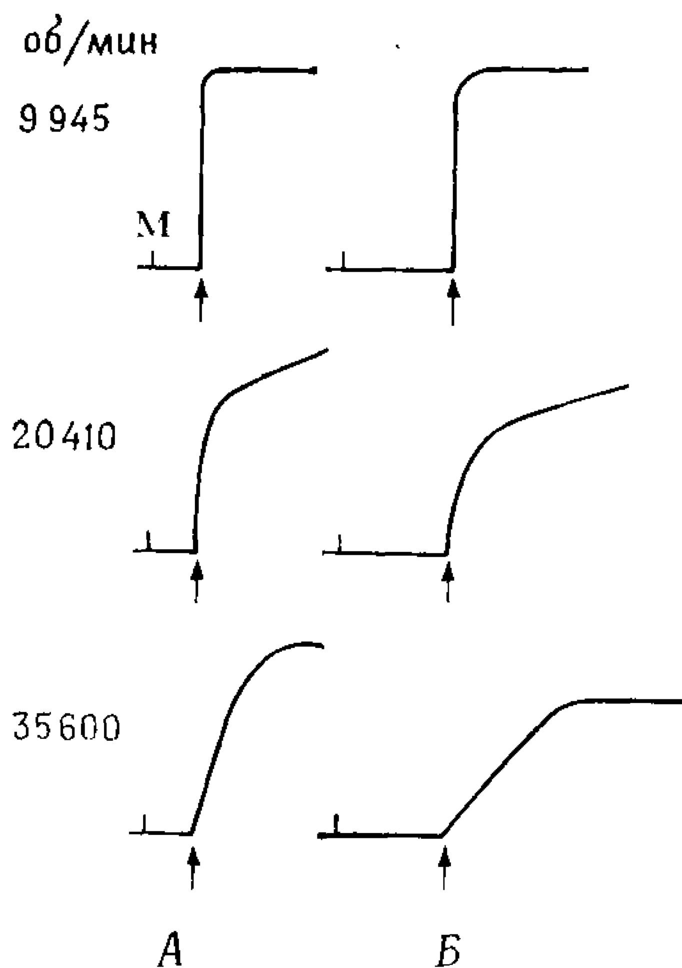


РИС. 11-15.

Результаты фотометрирования седиментограмм ДНК фага Т4 *E. coli* при регистрации по УФ-поглощению при трех скоростях.

В колонке *А* все стрелки, указывающие на основание границы, находятся приблизительно на равных расстояниях от мениска (*М*). Это справедливо и для колонки *Б*, однако расстояние в этом случае большее. Заметим, что при увеличении скорости бо́льшая доля ДНК кажется седиментирующей быстрее, чем следует из значения *s*, рассчитанного для положения, указанного стрелками. Это значение *s* ожидается для данной молекулярной массы ДНК. Более быстрая седиментация происходит за счет агрегации, зависящей от скорости (см. текст). Седиментация происходит слева направо.

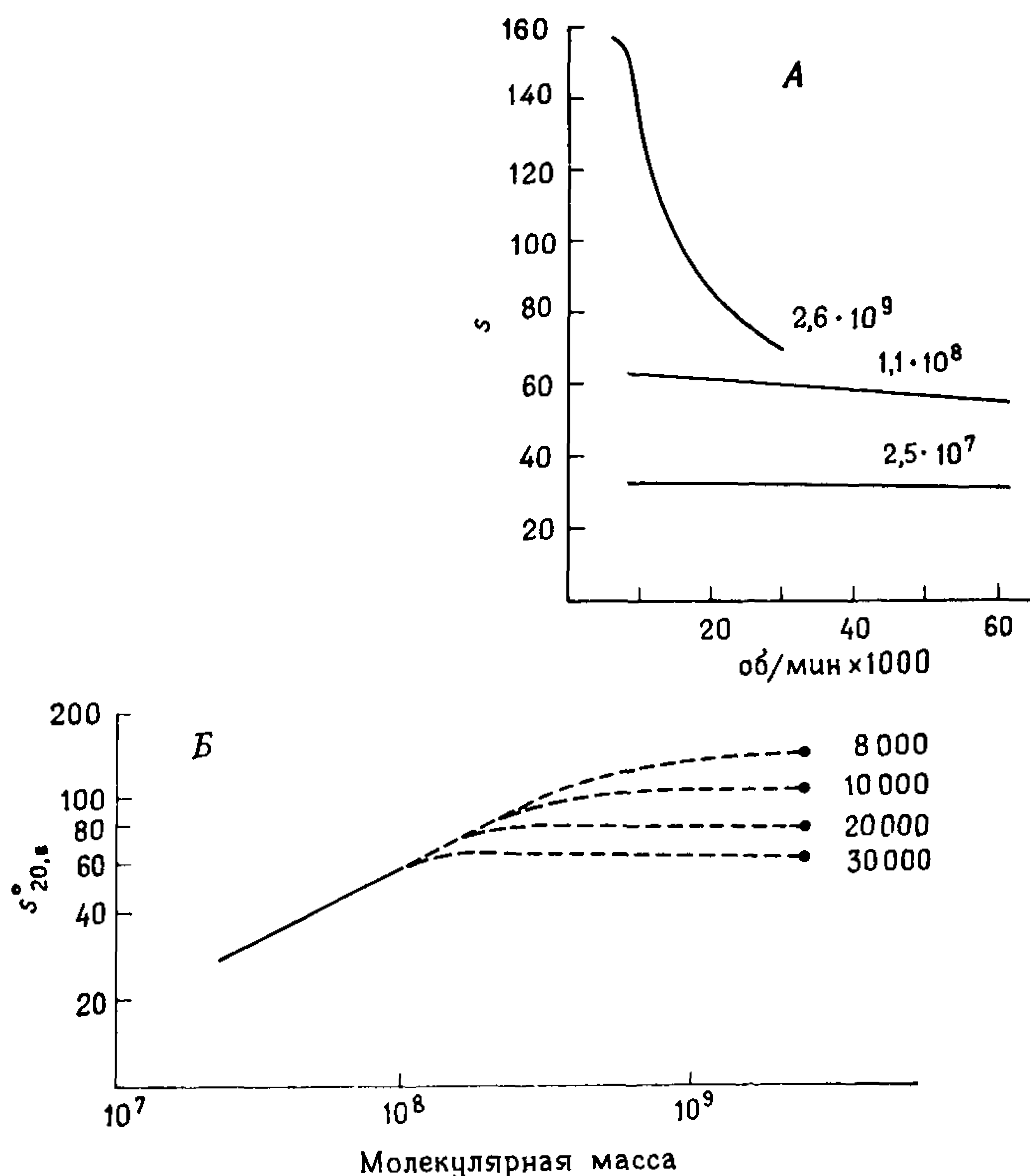


РИС. 11-16.

Два способа выражения скоростной зависимости *s*.

А — уменьшение *s* с увеличением скорости показывает, что этот эффект больше в случае большей молекулярной массы молекул. Приведены зависимости в случае ДНК интактных хромосом *E. coli* и фагов Т2 и Т7. Молекулярные массы в том же порядке указаны на рисунке. *Б* — зависимость *s* от *M* как функция скорости (указаны об/мин).

столько, чтобы существование подобных агрегатов стало невозможным. На рис. 11-15 приведены данные, указывающие на существование такой агрегации, зависящей от скорости. Сравнивали концентрацию ДНК при трех различных скоростях через два промежутка времени. При самой высокой скорости концентрация ДНК во времени уменьшалась, что связано с образованием осадка. При самой низкой скорости она остается довольно постоянной. Отметим, что значения *s*, измеренные при самой высокой и самой низкой скоростях, составляют 50 и 37 соответственно. Такая кажущаяся потеря вещества служит веским доводом в пользу существования зависимости от скорости и указывает на необходимость проведения измерений при более низких скоростях.

Второй тип скоростной зависимости имеет место в случае очень больших молекул при низких концентрациях. Для ДНК Т4 (молекулярная масса $106 \cdot 10^6$) при переходе от 65 000 к 10 000 об/мин увеличение s составляет 9%. При еще больших молекулах ДНК, молекулярная масса которых превышает $500 \cdot 10^6$, скоростная зависимость становится значительной и может приводить к ошибке в 3 и даже в 8 раз при оценке молекулярной массы. Важность этого явления легко оценить, если принять во внимание то, что хромосомы бактерий и клеток эукариотов обладают ДНК с молекулярной массой в пределах от $2 \cdot 10^9$ до $10 \cdot 10^9$. В качестве иллюстрации на рис. 11-16 показано, что после достижения определенной скорости зависимость s от молекулярной массы исчезает. Зимм объяснил этот удивительный факт изменением формы (протяженности) молекулы ДНК при высокой скорости из-за увеличения торможения трением у концов молекулы. (Предполагают, что скоростная зависимость такого типа отсутствует для кольцевых молекул ДНК, однако пока это еще не проверено.) Отсюда ясно, что для проведения различий в молекулярной массе очень больших молекул ДНК необходимо использовать центрифугирование при весьма низких скоростях (или проводить измерения упруговязкостных свойств, см. гл. 13).

Влияние заряда

Если молекула заряжена (это обычное явление для биологических макромолекул) и седиментация проводится в растворе с низкой ионной силой ($<0{,}01$), наблюдаются сильные эффекты растворителя, которые не связаны с изменениями формы макромолекулы. Поскольку для макромолекул характерно большее значение s по сравнению с нейтрализующими ионами («противоионами», такими, как Na^+ или Mg^{2+}), ионизованная макромолекула седиментирует быстрее, чем противоионы. Распределение заряда приводит к возникновению градиента потенциала, противоположного направлению седиментации, который вызывает уменьшение s. Это осложнение легко устраняется при использовании избытка противоионов. В практике, например, используется избыток ионной силы 0,05.

Стандартные коэффициенты седиментации

Если изучение скорости седиментации проводить в различных системах раствор — растворитель, измеренное значение s будет зависеть от плотности раствора (влияние величины $1 - \bar{v}\rho$), вяз-

кости раствора (в вязкой среде молекула будет двигаться медленнее) и температуры (в первую очередь из-за влияния температуры на плотность и вязкость). Для получения возможности сравнивать экспериментальные значения, полученные в различных системах растворителей и при различных температурах, наблюдаемые значения приводят к стандартным растворителю и температуре. При этом принимается, что изменение системы не приводит к изменению парциального удельного объема и коэффициента трения. Это предположение, по-видимому, довольно справедливо (хотя и не всегда обосновано), пока концентрация противоионов не слишком велика, а в растворе отсутствуют молекулы, связывающиеся с макромолекулами *.

Условились приводить коэффициенты седиментации к стандартному растворителю, имеющему вязкость и плотность воды при 20°С, с помощью уравнения

$$s_{20,\,\text{в}} = s_{\text{эксп}} \cdot \frac{1 - \bar{v}\rho_{20,\,\text{в}}}{1 - \bar{v}\rho_T} \cdot \frac{\eta_T}{\eta_{20}} \cdot \frac{\eta}{\eta_0}, \qquad (5)$$

где $s_{20,\,\text{в}}$ — стандартное значение s, $\bar{v}$ — парциальный удельный объем, $\rho_{20,\,\text{в}}$ и ρ_T — плотности воды при 20°С и растворителя соответственно, η/η_0 — отношение вязкостей растворителя и воды, η_T/η_{20} — отношение вязкости воды при температуре T к ее вязкости при 20°С.

Соответствующие значения η для многих систем растворитель — растворенное вещество можно найти в справочниках, отсутствующие в них величины могут быть определены с помощью вискозиметрии (гл. 13).

Для этой поправки, как и для расчета молекулярной массы, приведенного в конце данной главы, необходимо знать величину $\bar{v}$. Методы определения значения $\bar{v}$ приведены в гл. 12.

---

* Проблема состоит в том, что почти все уравнения, используемые в центрифугировании, выводятся при допущении, что система состоит только из двух компонентов — молекул растворителя и молекул, седиментационные свойства которых требуется изучить. Однако на практике обычно этого не бывает вследствие добавления проотивоионов. Реальная концентрация противоионов составляет от 0,01 до 1,0 М, тогда как концентрация изучаемых молекул — от $1{,}0 \cdot 10^{-5}$ до $1{,}0 \cdot 10^{-3}$ М. Обычно это осложнение игнорируют, так как при концентрации соли менее 0,05 М не отмечается никаких аномалий. Однако для 1 М NaCl, служащего обычным растворителем для ДНК, должны быть введены некоторые поправки. Тем не менее, как правило, этого не делают, поскольку гидродинамическая теория седиментации ДНК еще до конца не разработана, так что эти поправки не вносят существенных различий. Однако проблема становится достаточно острой при седиментации белков в 5 М хлориде гуанидиния или 7 М мочевине.

Факторы, влияющие на значение стандартного коэффициента седиментации

Трение: влияние формы

Рассмотрим простой пример, показывающий, какие факторы влияют на коэффициент трения. Если шар и стержень с одинаковыми массами и плотностями центрифугировать в вязкой среде, можно интуитивно заключить, что шар будет двигаться быстрее, поскольку он более компактен. (Дело обстоит иначе, если ось стержня ориентирована вдоль направления движения. Однако броуновское движение заставляет стержень, как и любую другую частицу, вращаться, поэтому утверждение остается в силе.) Общее правило гласит, что, чем более вытянутую форму имеет объект, тем большим будет сопротивление его движению, т. е. возрастет коэффициент трения. Этот простой пример позволяет понять, почему коэффициент седиментации вытянутых полужестких молекул заметно увеличивается, если разрушить внутримолекулярную структуру, обеспечивающую повышенную жесткость. Наглядный пример этого можно полчить при изучении ДНК.

Пример 11-Б. *Обнаружение денатурации ДНК с помощью ультрацентрифугирования.* Жесткость молекулы ДНК обусловлена в первую очередь ее двухцепочечной спиральной структурой, в которой основания нуклеотидов расположены одно над другим (гл. 16), причем основания противоположных цепей связаны между собой водородными связями. При повышении температуры раствора ДНК водородные связи разрываются, в результате чего нарушается тенденция к регулярному расположению оснований. При потере жесткости из-за разрывов водородных связей между основаниями и нарушении их регулярной упаковки молекула ДНК приобретает способность изгибаться. В результате этого уменьшается «вытянутость» молекулы, что приводит к увеличению s. Чем больше происходит внутримолекулярных разрывов, тем более гибкой становится молекула, менее жесткой и менее вытянутой, что приводит к увеличению s. Этот процесс продолжается до тех пор, пока не разорвется последняя водородная связь. В этой точке происходит разделение двух цепей ДНК, что приводит к образованию двух единиц, каждая из которых имеет молекулярную массу, равную половине молекулярной массы исходной структуры. Иллюстрацией такого явления служит рис. 11-17, на котором приведена зависимость s для ДНК с молекулярной массой 25 000 000 от температуры раствора ДНК. За период разрывов значение s возрастает на 220%, после чего резко

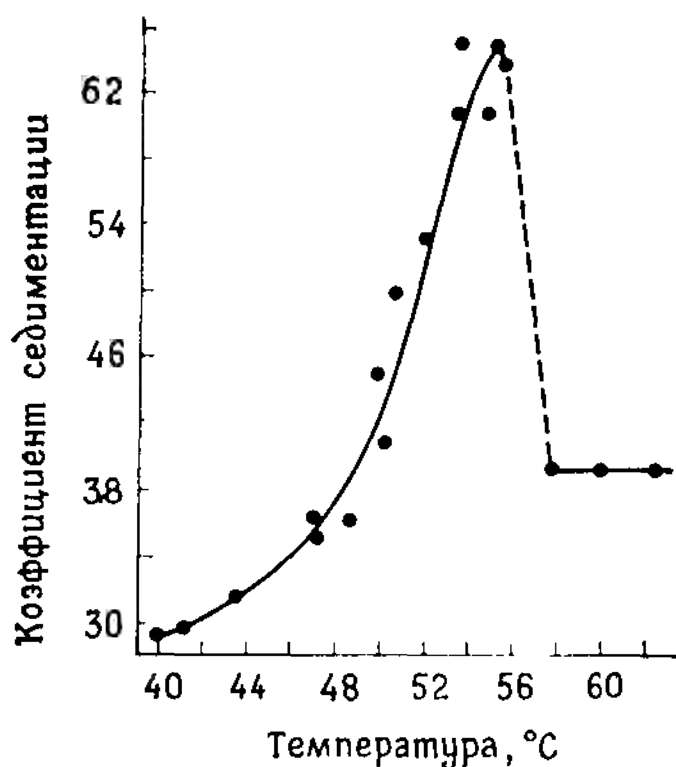


РИС. 11-17.

Коэффициент седиментации четкой границы ДНК фага Т7, полностью или частично денатурированной нагреванием при указанной температуре в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,8) в присутствии формальдегида.

Формальдегид предотвращает повторное образование водородных связей при охлаждении раствора до 20°С для центрифугирования. Штриховая линия соответствует разделению цепей [*Freifelder D., Davison P. F.*, Biophys. J., 3, 49—63 (1963)].

падает в точке разделения цепей (так как молекулярная масса уменьшается вдвое). Интересно, что это простое измерение было одним из первых указаний на то, что цепи ДНК способны разделяться.

Молекулярная масса

Из уравнения (2) следует, что s возрастает с увеличением M в том случае, когда парциальный удельный объем ($\bar{v}$) и коэффициент трения (f) постоянны. Значения $\bar{v}$ обычно не претерпевают больших изменений при изменениях M, хотя они меняются в зависимости от аминокислотного состава белков. С другой стороны, коэффициент трения сильно зависит от M. За последние 20 лет было сделано немало попыток рассчитать зависимость между s и M (фактически соотношения f — M). Эта задача относительно проста для жестких стержней и твердых сфер, поэтому для глобулярных белков эта теория дает удовлетворительные результаты. Для гибких стержней, таких, как ДНК, этот подход не принес успеха, хотя недавно и был достигнут некоторый прогресс.

Для более обычных задач, связанных с использованием s для определения M или изменений M, проблема решается с применением эмпирических соотношений между s и M. Этот подход оказался успешным в случае ДНК, хотя применяемые уравнения постоянно модифицируются с целью более точных измерений M для

различных ДНК *. Для двухцепочечных Na-ДНК при нейтральном pH в 1 M NaCl в случае седиментации в ячейке секториальной формы лучшим уравнением в настоящее время является следующее:

$$s^0_{20,\,в} = 2{,}8 + 0{,}00834M^{0{,}497}. \quad (6)$$

К сожалению, это уравнение выведено на основании данных по сравнительно небольшому количеству молекулярных масс, поэтому со временем оно может несколько видоизмениться. Следует подчеркнуть, что значение *s* изменяется медленнее, чем *M*, поэтому только значение *s* нельзя использовать для определения *M* из-за возможности получения значительной ошибки. Например, ошибка в значении *s* в 5% приводит к получению для значения *M* ошибки, равной 10%. Значение *s* для ДНК можно измерить с точностью до 2%, однако это делается редко. Так как соотношение *s* — *M* получено эмпирическим путем, важно, чтобы это уравнение использовалось для определения *M* только в тех случаях, когда значение *s* не выходит за пределы (10—60), для которых это уравнение было получено.

Для глобулярных белков *s* изменяется приблизительно как $M^{2/3}$, поэтому ошибка в 5% при измерении *s* дает ошибку около 7% при определении *M*. Так как *s* для белков может быть измерен с точностью до 1%, это позволяет получить достаточно достоверные результаты. Однако эмпирическое уравнение белков обладает тем недостатком, что *s* варьирует в зависимости от аминокислотного состава.

Как будет видно из следующего раздела, есть лучшие способы точного определения *M*, а *s* обычно измеряется для анализа *изменений M* или формы.

Метод точного измерения коэффициента седиментации

Поскольку измерение *s* связано с некоторыми ограничениями, крайне необходимо иметь метод, позволяющий получать достоверные значения *s*. Прежде всего, для устранения эффектов заряда ионную силу необходимо поддерживать в пределах от 0,05 до 1,0, а pH требуется регулировать подходящим буфером. Измерения нужно проводить при нескольких скоростях, отличающихся друг от друга приблизительно на 50%, чтобы удостовериться в отсутствии скоростной зависимости. При данной скорости сле-

* В литературе имеется и ряд других уравнений. Их недостатком является то, что они получены на основе *M*, значения которых определены с серьезными ошибками. Источники этих ошибок обсуждаются в некоторых ссылках, приведенных в конце главы.

дует использовать по меньшей мере четыре концентрации (включая наименьшую доступную концентрацию), чтобы убедиться в однородности вещества или установить точное соотношение компонентов, а уже потом определять s^0. После этого рассчитывают $s^0_{20,\text{в}}$. Простой метод расчета $s^0_{20,\text{в}}$ приведен в приложении к этой главе.

При этом следует помнить, что $s^0_{20,\text{в}}$ определяется не для «голой» макромолекулы, а для молекулы *со связанными с ней противоионами и другими лигандами*. Это обычно не проявляется в значительной степени. Если концентрация противоиона не влияет серьезным образом на форму или $\bar{v}$ (о чем упоминалось выше), в этом случае значение $s^0_{20,\text{в}}$ будет одинаковым, например, для 0,1 М и 1,0 М NaCl, а также для 0,1 М и 1,0 М CsCl. Однако в случае ДНК иногда это значение неодинаково для равных концентраций NaCl и CsCl, поскольку в одном случае получается Na-ДНК, а в другом — Cs-ДНК, которые имеют среднюю молекулярную массу нуклеотида 335+23=359 и 336+137=453 соответственно. (Средняя молекулярная масса нуклеотида составляет 336; Na и Cs имеют атомные массы 23 и 137 соответственно.) В обоих случаях s отражает действительную молекулярную массу, однако это заключение носит характер вероятного, что вытекает из того факта, что эмпирическое уравнение (6) было получено только для Na-ДНК. Это все справедливо и для белков, которые способны связывать катионы, анионы или и те и другие одновременно.

Примеры использования скоростной седиментации

В приведенных ниже примерах скоростная седиментация используется для определения относительных количеств материала, имеющего различные значения s. Интересно отметить, что уверенные выводы делаются без необходимости знания точных значений действительного s.

Пример 11-В. *Механизм инактивации бактериофагов при рентгеновском облучении.* Если бактериофаги облучать рентгеновскими лучами, они теряют жизнеспособность. Возможным объяснением этого может служить расщепление ДНК фагов при облучении. Для изучения этого процесса фаги подвергали облучению, после чего отбирали пробы, получившие различные дозы, для определения жизнеспособности и анализа ДНК методом ультрацентрифугирования. На рис. 11-18, *А* изображены седиментационные диаграммы двух ДНК фагов, получивших две различные дозы облучения. При увеличении дозы большая часть ДНК седи-

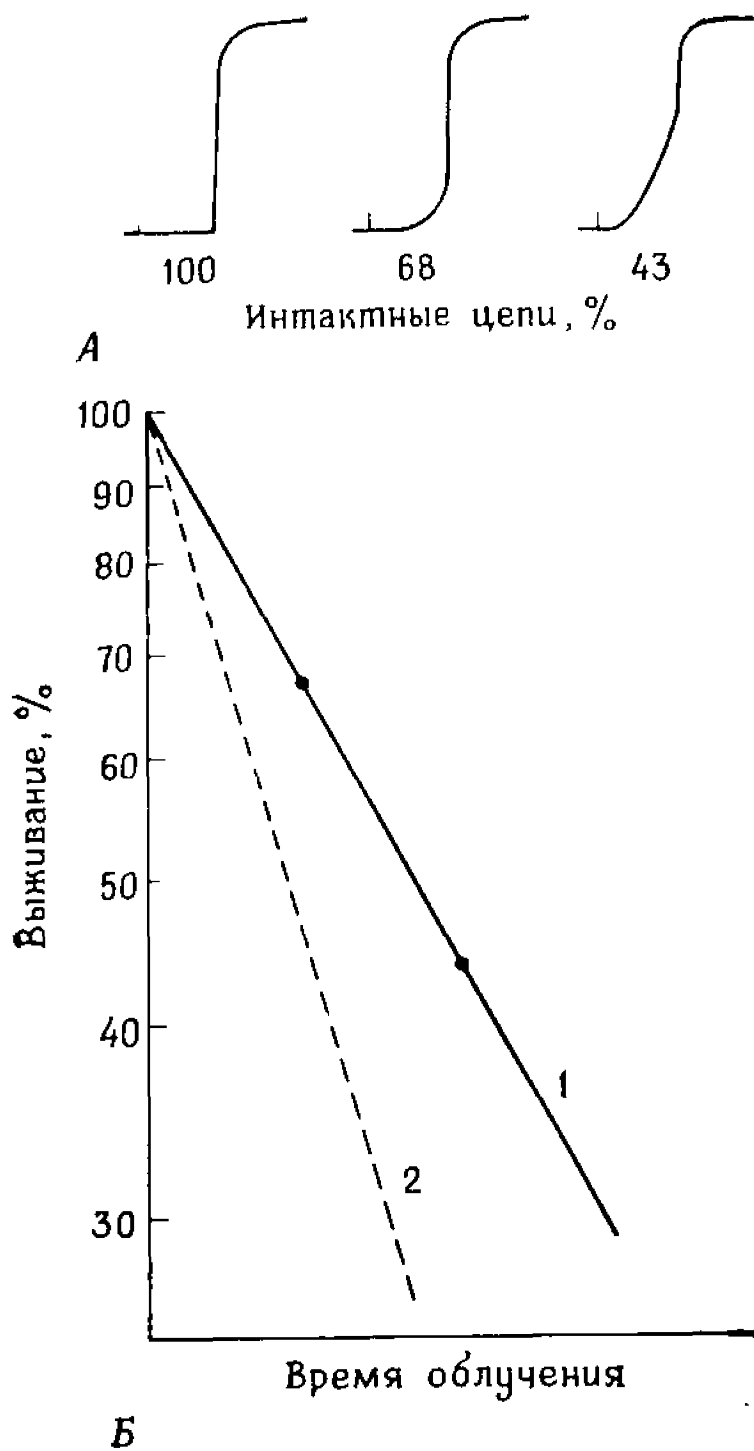


РИС. 11-18.

А — седиментограмма ДНК фага B3 *Pseudomonas aeroginosa* после двух доз рентгеновского облучения. *Б* — график зависимости доли интактных двойных цепей от времени рентгеновского облучения в сравнении с долей выживающих фагов. Для сравнения скоростей инактивации и разрывов цепей необходимо измерение относительных доз, что дает одинаковый уровень выживания.

1 — ДНК; *2* — фаг.

ментирует медленнее; это соответствует расщепленным молекулам. Фракция целых молекул определялась по методике, показанной на рис. 11-8. Сопоставление количеств целых молекул и доли выживающих фагов с дозой (рис. 11-18, *Б*) показывает, что гибель фагов протекает с большей скоростью, чем разрыв ДНК, причем ДНК разрывается со скоростью в 2 раза меньшей, чем гибнут фаги. Если облучение проводить в отсутствие кислорода (в атмосфере азота), фаги становятся более устойчивыми к облучению, хотя скорость расщепления ДНК остается прежней. Если построить график, показанный на рис. 11-18, *Б*, то можно установить, что скорость гибели становится равной скорости расщепления. Таким образом, этот простой анализ позволяет сделать заключение о двух типах гибели фагов: процессе, не зависящем от присутствия O_2 и обусловленном только расщеплением ДНК, и процессе, который зависит от присутствия O_2 и не включает расщепления ДНК.

Пример 11-Г. *Связывание фермента с кофактором.* Кофактор, восстановленный дифосфопиридиннуклеотидом (ДФН-Н), связывается с ферментом лактатдегидрогеназой (ЛДГ) из сердца цыпленка. Для понимания механизма действия фермента необходимо

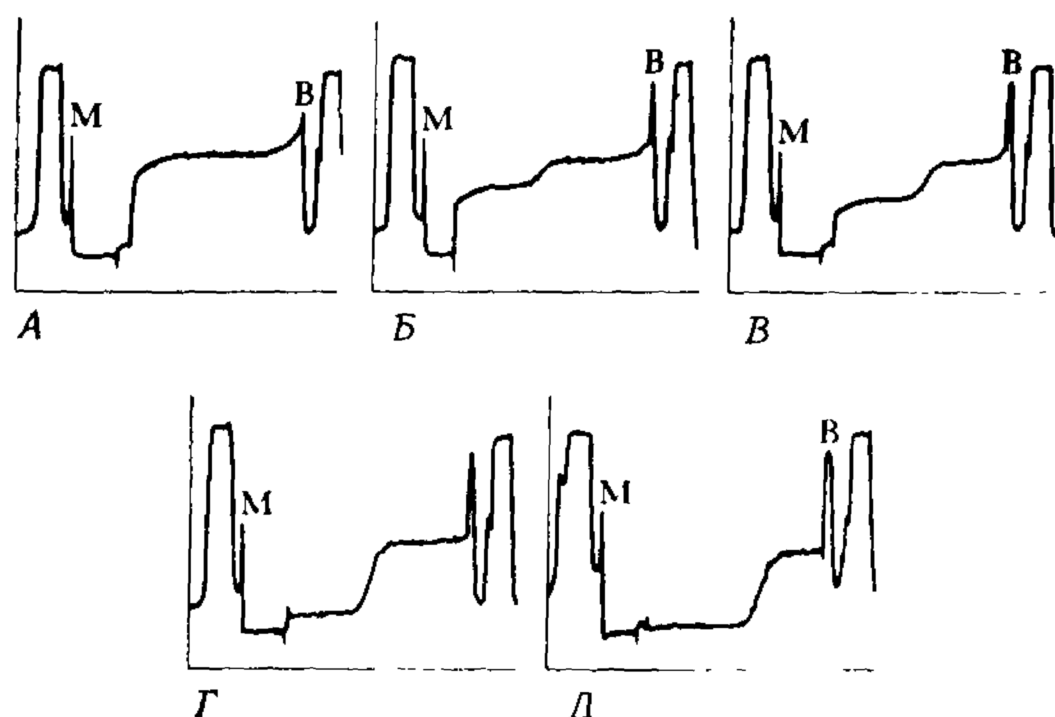


РИС. 11-19.

Седиментограммы различных смесей лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и кофермента восстановленного дифосфопиридиннуклеотида (ДФН-Н).

Поглощение регистрировали при помощи сканнера при длине волны 340 нм. *А* — ДФН-Н без ЛДГ; *Б—Д* — ДФН-Н/ЛДГ=12, 8, 4 и 2 соответственно. Седиментация происходит слева направо: М и В — мениск и дно ячейки соответственно [*Schachman H. K., Edelstein S. I.*, Methods Enzymol., 27, 3—58 (1973)].

знать число центров связывания и константы диссоциации, характеризующие различные состояния равновесия. Иными словами, необходимо провести анализ связывания. Это можно осуществить с помощью ультрацентрифугирования. При использовании абсорбционной системы и света с длиной волны 340 нм (который поглощается ДФН-Н, но не ЛДГ) седиментацию можно применить для обнаружения ДФН-Н (рис. 11-19). Если присутствует только ДФН-Н, видна граница с $s=0{,}2$. При добавлении ЛДГ появляется граница с $s=7$ (значение, отвечающее чистой ЛДГ). Следовательно, ДФН-Н осаждается вместе с ЛДГ, т. е. связывается с ней. При возрастании количества ЛДГ можно измерять относительные количества ДФН-Н при $s=0{,}2$ и $s=7$ и сделать из этого выводы о доле связывающегося кофермента. С помощью такого простого анализа можно определить зависимость отношения связанного к несвязанному ДФН-Н как функцию концентрации ДФН-Н и ЛДГ, pH, ионной силы и т. д.

Пример 11-Д. *Индикация прочности пар оснований в ДНК.* При обработке ДНК эндонуклеазой или облучении рентгеновскими лучами происходят разрывы единичных цепей. При накоплении таких разрывов в конце концов самые отдаленные разрывы двух отдельных цепей становятся достаточно близкими, чтобы получились разрывы двойной цепи, что приводит к фрагментации двухцепочечной ДНК. Так как прочность водородных связей зависит от температуры и ионной силы, можно ожидать, что минимальное разделение двух одноцепочечных разрывов, ко-

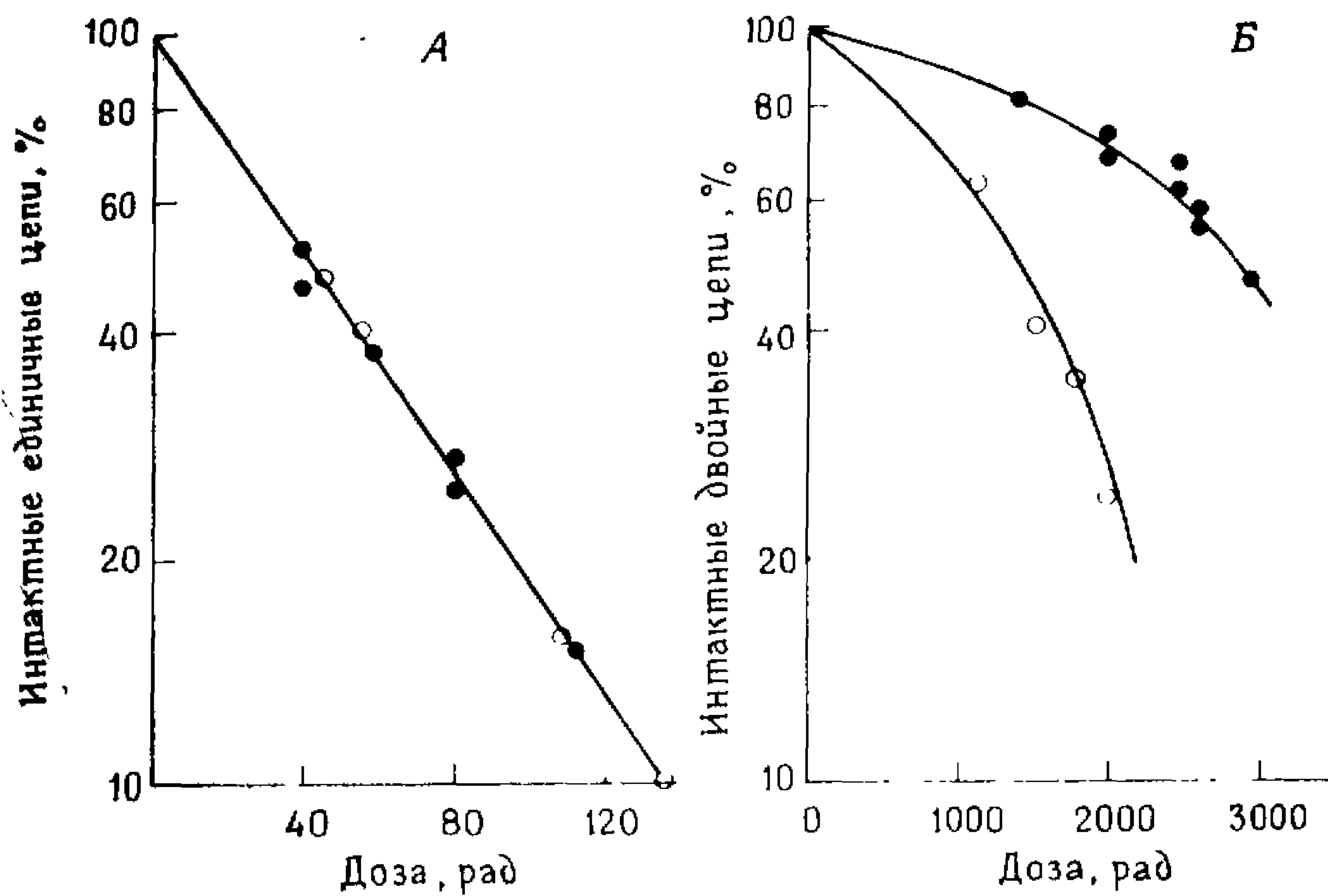


РИС. 11-20.

Количество интактных единичных и двойных цепей ДНК фага В3 *Pseudomonas aeroginosa* после введения одноцепочечных разрывов при рентгеновском облучении.

Облученную ДНК седиментировали в щелочной (*А*) и нейтральной (*Б*) средах для измерения количества одно- и двухцепочечных разрывов [*Freifelder D., Trumbo B.*, Biopolymers, 7, 681—693 (1969)]. ● высокая ионная сила; О низкая ионная сила.

торое не приводит к разрыву двойной цепи, также будет зависеть от этих параметров. Для определения одноцепочечных разрывов достаточно седиментации ДНК в щелочной среде, поскольку при больших pH двойная спираль расплетается с образованием двух отдельных полинуклеотидных цепей. Для изучения этого ДНК подвергали облучению рентгеновскими лучами и разрывы единичных и двойных цепей определяли седиментацией при щелочных и нейтральных pH (рис. 11-20). Доля нерасщепленных одно- и двухцепочечных молекул ДНК определялась для каждой дозы с использованием методики, показанной на рис. 11-8. Из относительно простого уравнения

$$h = [L(1 - F^{1/b})/2b] - \frac{1}{2},$$

где h — минимальное число пар оснований, необходимое для поддержания структуры; L — число нуклеотидов в одной цепочке; F — доля нерасщепленных двухцепочечных молекул и b — половина среднего числа разрывов на одну цепь, можно рассчитать минимальное число пар оснований, требующееся для поддержания двухцепочечной интактной молекулы. Нашли, что оно равно 2,6 и 15,8 в 0,01 и 1,0 М NaCl при 25°С соответственно.

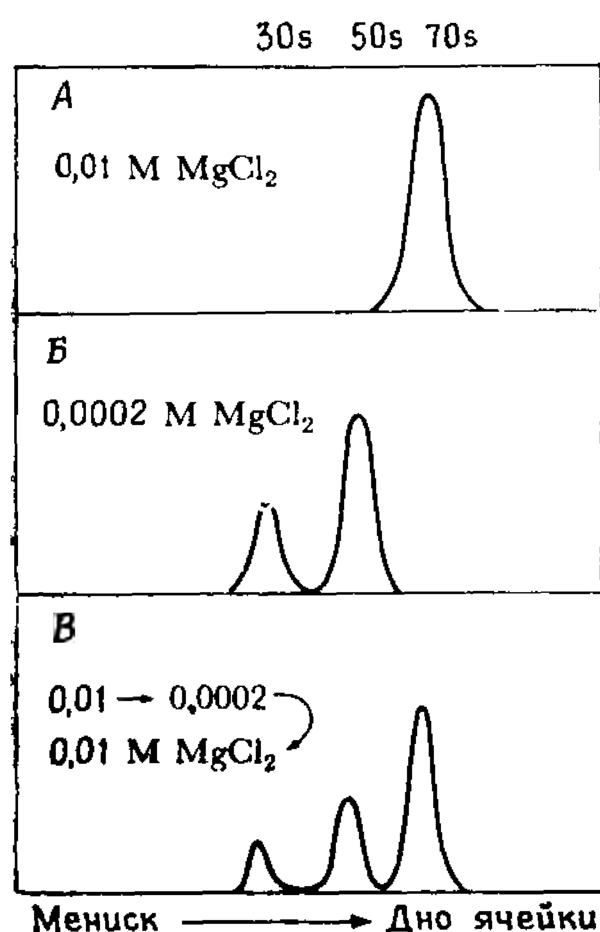


РИС. **11-21.**

Изучение диссоциации и ассоциации рибосом *E. coli* по скорости седиментации.

На рисунке изображены шлиреновские седиментограммы рибосом при разных концентрациях Mg^{2+}. *А* — в 0,01 М $MgCl_2$ 70s рибосома стабильна; *Б* — в 0,0002 М $MgCl_2$ она диссоциирует на одну 50s и одну 30s рибосомы (площади пиков относятся как 2 : 1, поскольку молекулярная масса 50s примерно в 2 раза больше, чем 30s); *В* — частичная реассоциация при переносе образца *Б* в 0,01 М $MgCl_2$. При более высокой концентрации Mg^{2+} появляется пик 100s.

Пример 11-Е. *Структура рибосом.* Для рибосом, выделенных из бактерии *E. coli,* найдено, что они состоят из четырех (как минимум) компонентов с $s=30$, 50, 70 и 100 (рис. 11-21). С помощью седиментационного анализа можно показать, что эти компоненты представляют собой ассоциированные системы, зависящие от концентрации ионов Mg^{2+}, причем частицы 30s и 50s объединяются с образованием частицы 70s, а две частицы 70s объединяются в частицу 100s. Это хорошо видно из рис. 11-21 по исчезновению пиков и возникновению их в новом месте, причем относительная площадь отражает концентрацию материала с каждым значением *s*.

Зональное центрифугирование в предварительно подготовленном градиенте плотности

В предыдущих разделах речь шла о методиках центрифугирования, в которых начальный раствор содержал макромолекулы с однородным распределением по ячейке, а вся информация получалась из наблюдения продвижения границ молекул при их седиментации в центрифужной пробирке. Хотя этот метод имеет множество достоинств и идеален для аналитического ультрацентрифугирования, неудобство его состоит в том, что молекулы с различными значениями *s* никогда не отделяются одна от другой, поскольку быстро осаждаемые молекулы движутся через раствор

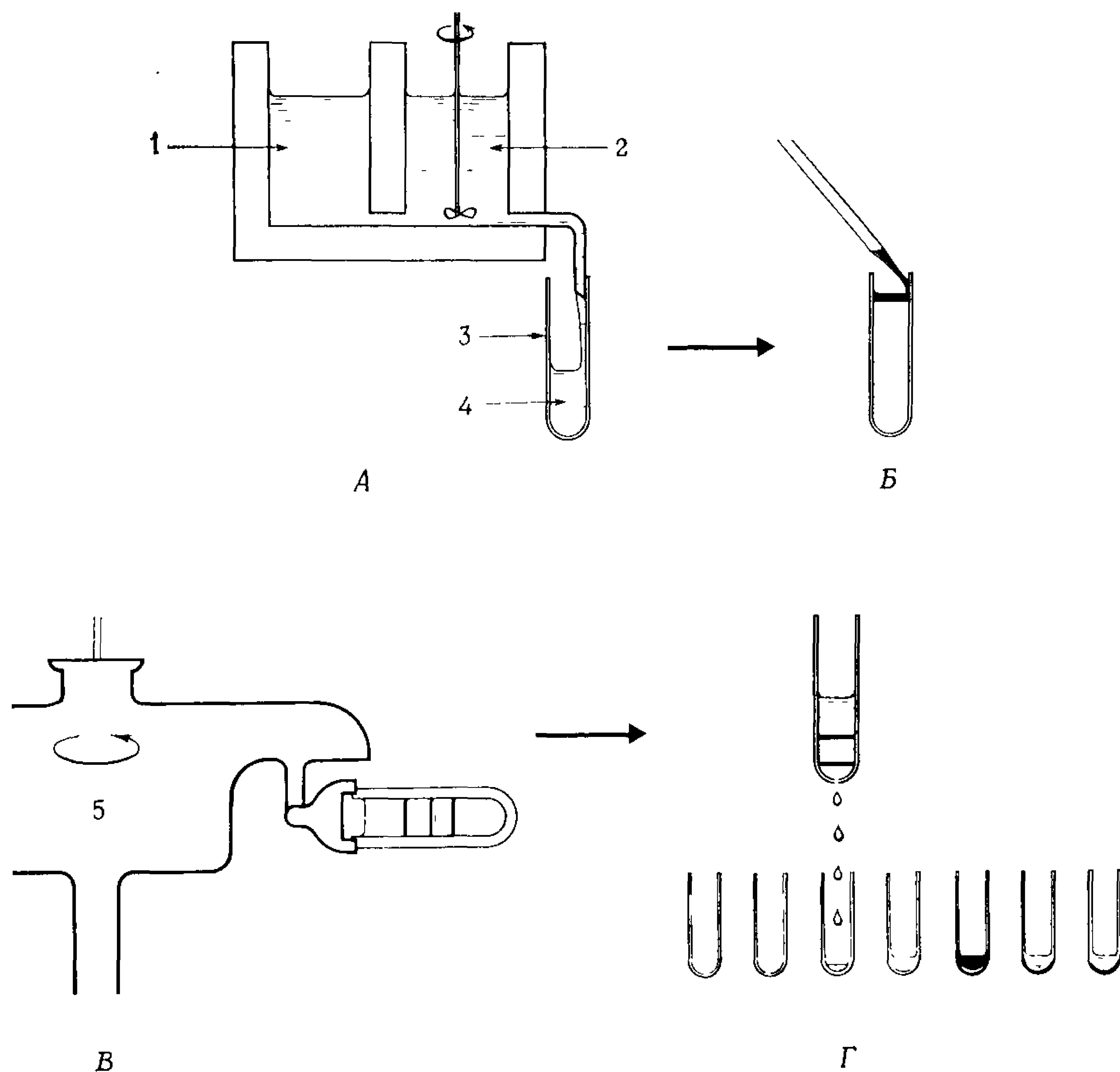


РИС. 11-22.

Последовательность операций в зональном центрифугировании.

А — получение градиента; *Б* — образец наносят тонким слоем поверх градиента; *В* — пробирку помещают в ротор с подвесными стаканами и центрифугируют. Компоненты образца разделяются в соответствии с их значениями *s*; *Г* — в дне пробирки иглой прокалывают отверстие, после чего содержимое пробирки по каплям собирают в ряд пробирок. *1* — раствор с низкой плотностью; *2* — раствор с высокой плотностью; *3* — центрифужная пробирка; *4* — градиент концентрации; *5* — ротор.

медленно осаждаемых молекул. Отсюда возникают два эффекта: 1) концентрационная зависимость всегда приводит к ухудшению разрешения и 2) если быстро осаждаемый компонент можно физически отделить от медленно осаждаемого, первый из них всегда будет содержать примесь второго, причем степень загрязнения можно только понизить при повторной седиментации. Идеальный метод должен давать возможность каждому виду молекул седиментировать только через растворитель. К такой ситуации позволяет приблизиться *зональное* или *полосовое* центрифугирование. Приводимое здесь описание седиментации выполнено на препа-

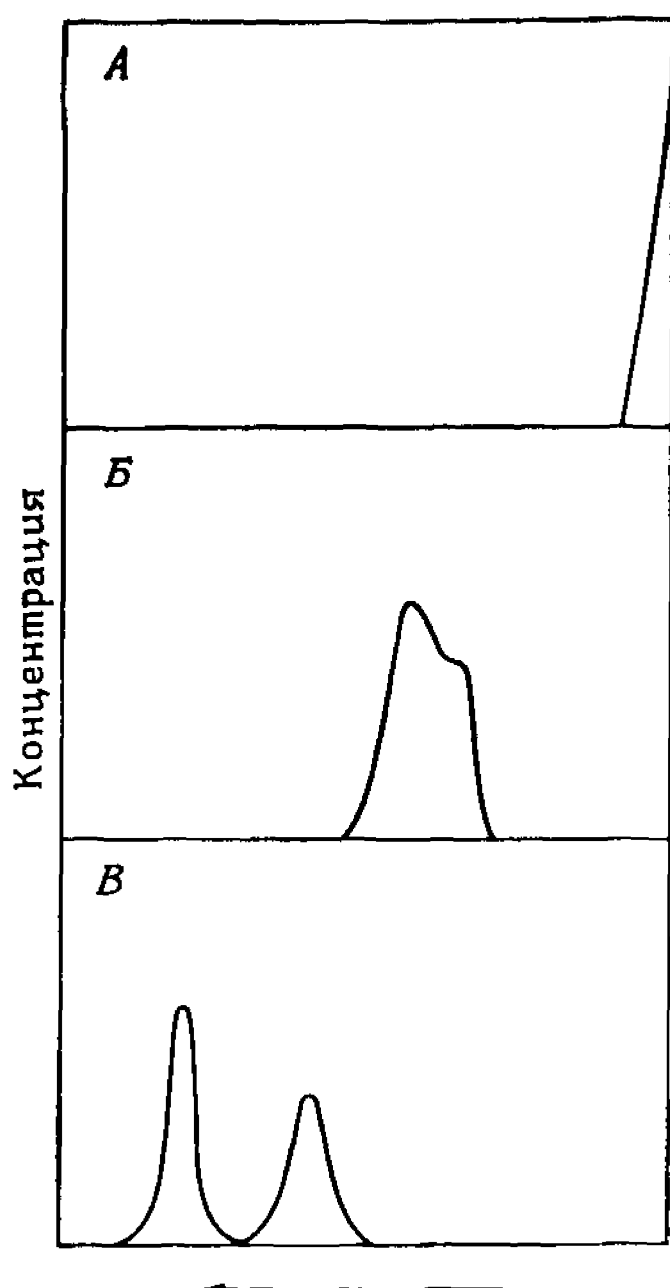


РИС. 11-23.

Разделение двух компонентов методом зонального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (седиментация происходит справа налево).

А — до центрифугирования; *Б* и *В* — при последовательно увеличенном времени центрифугирования.

ративной центрифуге с использованием ротора с подвесными стаканами (рис. 11-5). Далее будет показано, как этот метод можно применить в аналитической центрифуге с использованием специальных ячеек.

Принцип метода зонального центрифугирования показан на рис. 11-22. Небольшой объем раствора, содержащего молекулы, которые следует охарактеризовать, наносят в виде слоя на раствор предварительно приготовленного градиента концентрации, находящегося в центрифужной пробирке. Наносимый раствор всегда имеет плотность, меньшую, чем плотность верхнего слоя градиента (в противном случае он будет погружаться в градиент). Затем пробирку центрифугируют, при этом молекулы исходного слоя седиментируют через градиент. Если все молекулы имеют одинаковый коэффициент седиментации, то они будут седиментировать в виде узкой зоны, как показано на рис. 11-23. Если же в образце присутствуют молекулы с различными коэффициентами седиментации, то в ходе седиментации они будут разделяться. Различные компоненты будут разрешаться в виде серии зон или полос, которые затем седиментируют только через растворитель отдельно одна от другой. После окончания центрифугирования содержимое пробирки фракционируют, чаще всего собирая фракции по каплям через отверстие в дне пробирки

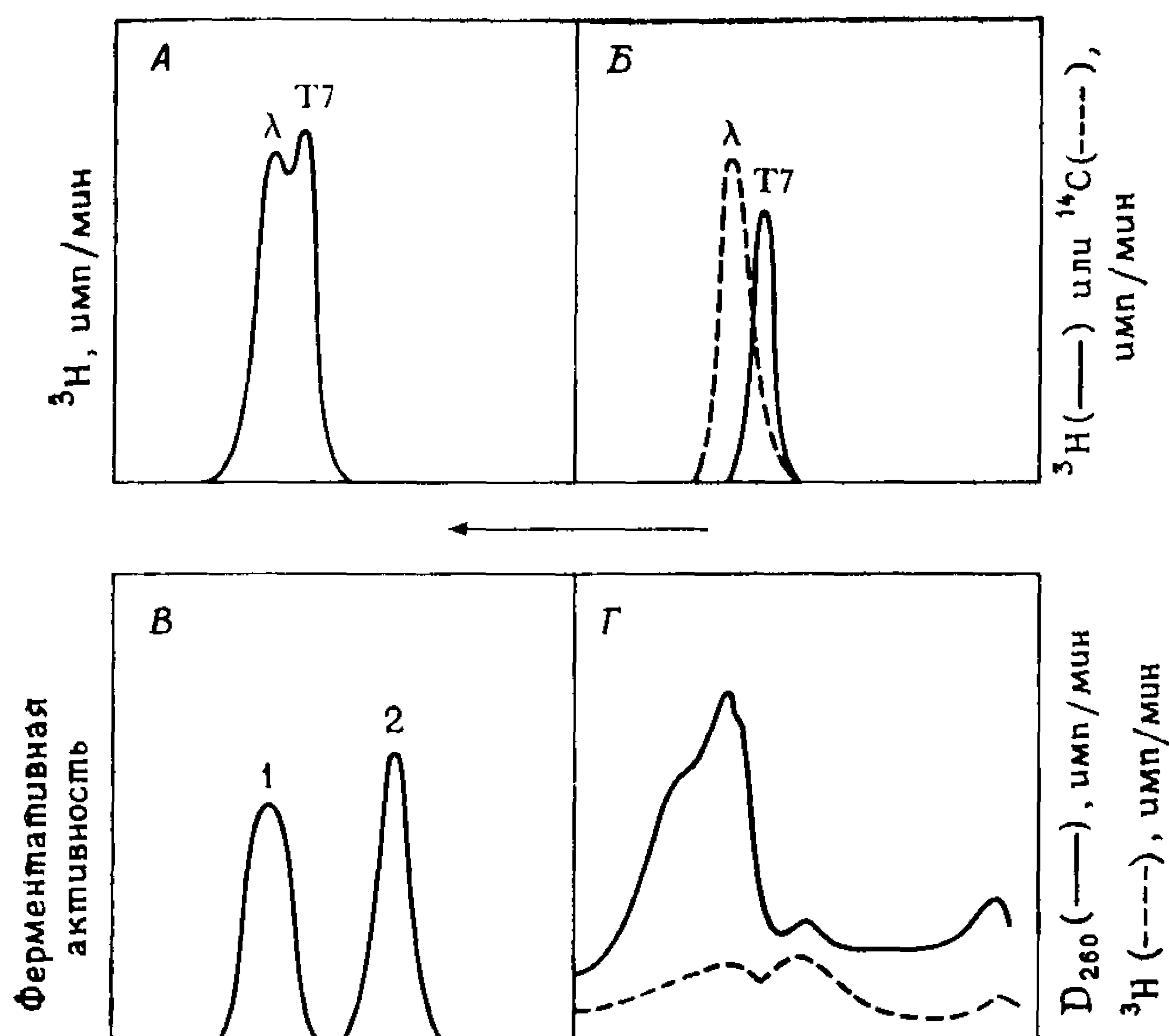


РИС. 11-24.

Некоторые способы анализа зонального градиента, позволяющие получить распределение концентрации.

А — ^3H-ДНК фага Т7 и ^3H-ДНК фага λ; *Б* — ^3H-ДНК фага Т7 и ^{14}C-ДНК фага λ; *В* — смесь двух ферментов; *Г* — включение ^3H-урацила в РНК (D_{260} указывает общее количество РНК). *1* — алкогольдегидрогеназа; *2* — каталаза.

(рис. 11-6). Если скорость протекания через отверстие достаточно мала, чтобы не вызывать турбулентности, каждая капля будет соответствовать единичному слою в пробирке. Каждая из фракций содержит одну или более капель. Для анализа веществ можно использовать разнообразные методы и в результате получать распределение концентраций. В аналитических центрифугах для определения молекул используют оптические системы (по УФ-поглощению, шлиреновскую или интерферометр Рэлея). Однако фракции, полученные при фракционировании содержимого пробирки по каплям, можно анализировать по радиоактивности, ферментативной активности, абсорбции, флуоресценции, с помощью химических тестов и т. д. Некоторые примеры использования этих методов показаны на рис. 11-24.

Для чего же в зональном центрифугировании нужен градиент концентрации? Посмотрим, что происходит при нанесении слоя раствора с низкой плотностью на раствор с высокой плотностью, в котором нет градиента концентрации. Вначале система будет стабильной за счет различий в плотности на границе раздела,

т. е. верхний раствор будет просто плавать на поверхности нижнего. Предположим теперь, что появляются небольшие изменения температуры в растворе (а они бывают всегда). Поскольку с повышением температуры плотность большинства растворов уменьшается, эти колебания температуры будут приводить к локальным инверсиям плотности (т. е. области с большей плотностью будут располагаться над областями с меньшей плотностью), что будет в свою очередь вызывать локальные перемещения жидкости, называемые *конвекцией*. Этот эффект обычно невелик и не оказывает существенного влияния на положение начальной границы, поскольку разность плотностей на границе обычно достаточно велика для того, чтобы перемешивания через границу не происходило (до тех пор, пока разность температур не становится больше 10—20°). Однако при седиментации изучаемые молекулы будут двигаться через более плотный нижний слой, где такая конвекция способна разрушить любую существующую зону. Введение крутого градиента плотности дает гарантию, что различия в плотности, способные вызвать потоки внутри градиента, могут быть результатом только очень больших изменений температуры. Второй важной функцией градиента плотности является предотвращение перемешивания в результате механических воздействий; любое возмущение будет нейтрализоваться стремлением системы вернуться к положению, при котором область с низкой плотностью расположена над областью с высокой плотностью. Кроме того, градиент позволяет решить еще одну проблему. Рассмотрим систему без градиента и без возможных температурных колебаний и механических воздействий, в которой седиментирующие молекулы уже проникли в нижний слой и образовали зону. В этой зоне наличие молекул увеличивает плотность раствора благодаря их собственному вкладу в плотность (обычно этот эффект очень мал, однако при использовании высоких концентраций он может быть значительным). Таким образом, плотность зоны больше плотности раствора сразу под ней, что приводит к появлению конвективных токов в зоне по направлению к дну ячейки. Если вместо этого седиментацию проводить в предварительно полученном градиенте концентрации, то седиментирующие молекулы будут постоянно проходить через область с большей плотностью. При этом плотность каждой области будет продолжать увеличиваться, однако при достаточно крутом градиенте вклад молекул в плотность будет недостаточным, чтобы привести к инверсии плотности, и система поэтому остается стабильной. Чаще всего для получения градиента используется сахароза, что связано с доступностью ее в чистом состоянии, низкой стоимостью и отсутствием взаимодействий с большинством химических реагентов, ферментов, а также возможностью применения оптических методов анализа. Если изучаемая макромо-

лекула представляет собой фермент или нестабильный белок, для создания градиента часто используют глицерин, в котором стабильно большинство белков, причем денатурирование в присутствии глицерина идет с большим трудом. С успехом применяют и градиенты H_2O — D_2O; этот метод является наилучшим, когда при изучении частицы требуется постоянное осмотическое давление. Примеры использования этих систем будут приведены ниже.

Определение коэффициента седиментации с помощью зонального центрифугирования в предварительно приготовленном градиенте плотности

При определении *s* с помощью зонального центрифугирования часто используют стандартные образцы (маркеры), значения *s* которых предварительно были определены методом аналитического ультрацентрифугирования. Однако даже в том случае, когда концентрация достаточно низка, чтобы можно было не принимать во внимание концентрационную зависимость седиментации (которая может достигать большой степени, если материал недостаточно чист), определение *s* с помощью зонального центрифугирования имеет подводные камни, которые не встречаются в аналитическом ультрацентрифугировании. Это можно объяснить тремя основными причинами. Во-первых, плотность и вязкость раствора увеличивается вдоль пробирки, поэтому суммарная сила, действующая на молекулу, здесь уже не является простой функцией расстояния. Во-вторых, стенки препаративных пробирок параллельны, поэтому они не совпадают с направлением седиментации, в результате чего происходит седиментация по стенкам с накоплением вещества. Это накопление приводит к локальным инверсиям плотности, вызывая некоторую конвекцию. В-третьих, значение *s* рассчитывается только по двум точкам, положению при времени, равном нулю, и после остановки центрифуги, так что истинная скорость движения остается неизвестной. Первая причина может быть рассмотрена очень сложным теоретическим путем, вторая теоретически описана, однако влияние ее на *s* до конца не установлено. Для избежания трудностей, связанных с первой причиной, обычно применяют изокинетические градиенты, т. е. концентрацию и плотность градиента подбирают таким образом, чтобы молекулы двигались с постоянной скоро-

стью на любом расстоянии от центра вращения. Эмпирическим путем было найдено, что таким свойством обладают растворы сахарозы с концентрацией от 5 до 20%. Важно помнить, что изокинетические свойства градиента концентрации зависят от изменения концентрации как функции *расстояния* вдоль пробирки; поэтому градиент от 5 до 20% сахарозы является изокинетическим для определенной пробирки (например, пробирки для роторов фирмы Beckman SW39, SW50 и SW65), однако это не так в случае более длинных пробирок (например, SW25 и SW41). Таким образом, для пробирок различной длины изокинетические градиенты при необходимости должны подбираться каждый раз отдельно. Студенты должны это постоянно помнить при чтении литературы, так как это бывает одной из причин того, что разные лаборатории сообщают о различных значениях s.

Существование второй и третьей причин делает определение абсолютного значения s затруднительным, поэтому на практике обычно применяют совместную седиментацию с молекулами с известными s, для которых s определили в аналитической ультрацентрифуге, что позволяет установить относительное значение s. На самом деле такой прием является не совсем корректным по следующим соображениям: $s_{20,\text{в}}^{0}$ для двухцепочечной ДНК изменяется как $M^{0,497}$ [уравнение (6)] при измерении в ячейке, имеющей форму сектора. Это уравнение будет справедливо в том случае, если ячейка содержит изокинетический градиент, в котором расстояние, проходимое в единицу времени (d), изменяется так же, как $M^{0,497}$. Однако при измерении соотношения между d и M в изокинетическом градиенте от 5 до 20% сахарозы в случае препаративной центрифуги получено соотношение

$$\frac{d_1}{d_2} = \left(\frac{M_1}{M_2}\right)^{0,38}, \tag{7}$$

где индексы 1 и 2 соответствуют двум независимо седиментирующим компонентам. Поскольку s пропорционален расстоянию в изокинетическом градиенте, значение s ДНК в градиенте сахарозы от 5 до 20% в препаративной ячейке (с параллельными стенками) будет отличаться от найденного в ячейке, имеющей форму сектора, поскольку показатели степени у M различны. (Скорее всего, это происходит вследствие конвекции, что обсуждалось во второй причине.) Из сказанного следует, что s нельзя определять из относительного расстояния. В случае белков дело обстоит не лучше. Однако проблема не так серьезна, как кажется, поскольку обычно значение s требуется только для оценки M. Так как соотношение s — M для большинства веществ является эмпирическим, таким же путем можно получить и соотношение d — M, используя относительные расстояния, проходимые за

определенные промежутки времени. Для ДНК такое соотношение описывается уравнением (7). Однако уравнение (7) имеет силу *только* для изокинетического градиента, и, по третьей причине, никогда не известно, является ли градиент изокинетическим. Эта сложность может быть устранена с помощью редко применяемой методики совместной седиментации двух или трех веществ с известными молекулярными массами, берущими неизвестную *M* «в вилку», с последующим измерением относительного *d* для двух различных времен центрифугирования. Простой график зависимости относительных *d* от lg *M* позволяет получить точное значение *M*.

Примеры использования зонального центрифугирования в препаративной ультрацентрифуге

В приведенных здесь примерах зонального центрифугирования изучаются очень малые количества материала, которые не могут быть определены с помощью оптических методов. Отметьте разнообразие методов анализа и обоснованность выводов.

Пример 11-Ж. *Обнаружение терминирования в синтезе РНК ρ-фактором E. coli.* При синтезе РНК РНК-полимеразой из матрицы ДНК синтез начинается с последовательностей оснований, носящих название промоторов, и оканчивается на терминирующей последовательности. Однако in vitro не получено данных о том, что терминирующая последовательность узнается. Джеффри Робертс выделил белок, который был назван ρ и понижал количество РНК, синтезируемой in vitro. Данные о том, что ρ дает информацию для узнавания терминирующих участков, были получены при анализе синтезируемой РНК методом зонального центрифугирования в градиенте сахарозы. Один из достаточно характерных экспериментов приведен на рис. 11-25. Если ρ понижает либо скорость инициации синтеза, либо скорость полимеризации после продолжительного периода синтеза (за который синтезируется большое число молекул), вид распределения молекул РНК должен быть одним и тем же как в присутствии ρ, так и без него. Если же он вызывает терминирование, молекулы РНК должны быть меньшими. Поскольку общая форма всех молекул РНК одна и та же, можно заключить, что в присутствии ρ синтезируемая РНК будет седиментировать более медленно, как показано на рис. 11-25.

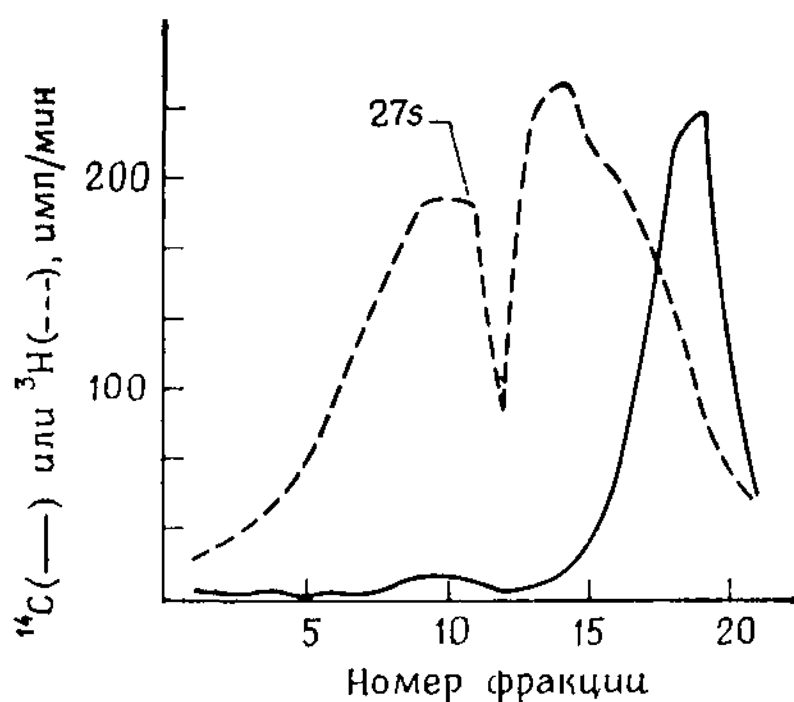


РИС. 11-25.

Зональная седиментация РНК, синтезируемой из матричной ДНК фага λ *E. coli* (градиент сахарозы 5—20%).

Использованы две реакционные смеси, содержащие ДНК фага λ, РНК-полимеразу *E. coli* и соответствующий буфер. — — — — РНК, синтезированная с включением ^{14}C-уридинтрифосфата (УТФ); ——— РНК, полученная с включением ^{3}H-УТФ в присутствии rho-фактора. Rho-фактор уменьшает молекулярную массу РНК. Седиментация справа налево [*Roberts J. W.*, Nature, 224, 1168—1174 (1969)].

Пример 11-3. *Измерение изменений величины мутантного фермента.* Многие методы, применяемые для определения молекулярных масс ферментов, требуют образцов с высокой степенью очистки (например, метод седиментационного равновесия, который будет описан позже) или при использовании не очень чистых образцов дают массы субъединиц (например, ДСН-гель-электрофорез, гл. 9). Использование зональной седиментации позволяет определить молекулярную массу активного фермента непосредственно в неочищенном лизате при применении в качестве метода контроля анализа ферментативной активности. Например, ДНК-полимераза I *E. coli* седиментирует при $s=5{,}4$. Зоны полимеризующей и 5′—3′-экзонуклеазной активности, связанные с этим белком, седиментируют вместе, поэтому для локализации фермента в градиенте сахарозы можно использовать любую из них. Мутантная форма фермента не обладает полимеразной активностью, однако сохраняет 5′—3′-экзонуклеазную. Как следует из рис. 11-26, мутантный фермент обладает значением $s=2{,}8$. Поскольку данная мутация является терминирующей цепь белка, пониженное значение s указывает на то, что данный фермент является лишь небольшим фрагментом белка дикого типа и имеет только 0,4% активности.

Пример 11-И. *Определение молекулярной массы ДНК фага Т7 с применением меченых концевых групп.* Фермент полинуклеотидкиназа Т4 может использоваться для введения радиоактивной метки по 5′-концу двухцепочечной ДНК (с помощью переноса ^{32}P из γ-^{32}P-АТФ на 5′-ОН-группу). Такая метка может применяться для определения молекулярной массы в том случае, когда известны количество ДНК и число связанных с ней атомов ^{32}P. Однако, если образец ДНК содержит расщепленные молекулы ДНК, значение M может оказаться заниженным, поскольку связано будет большое количество ^{32}P; например, если расщеплен 1% молекул на 100 фрагментов, наблюдаемое значение M будет

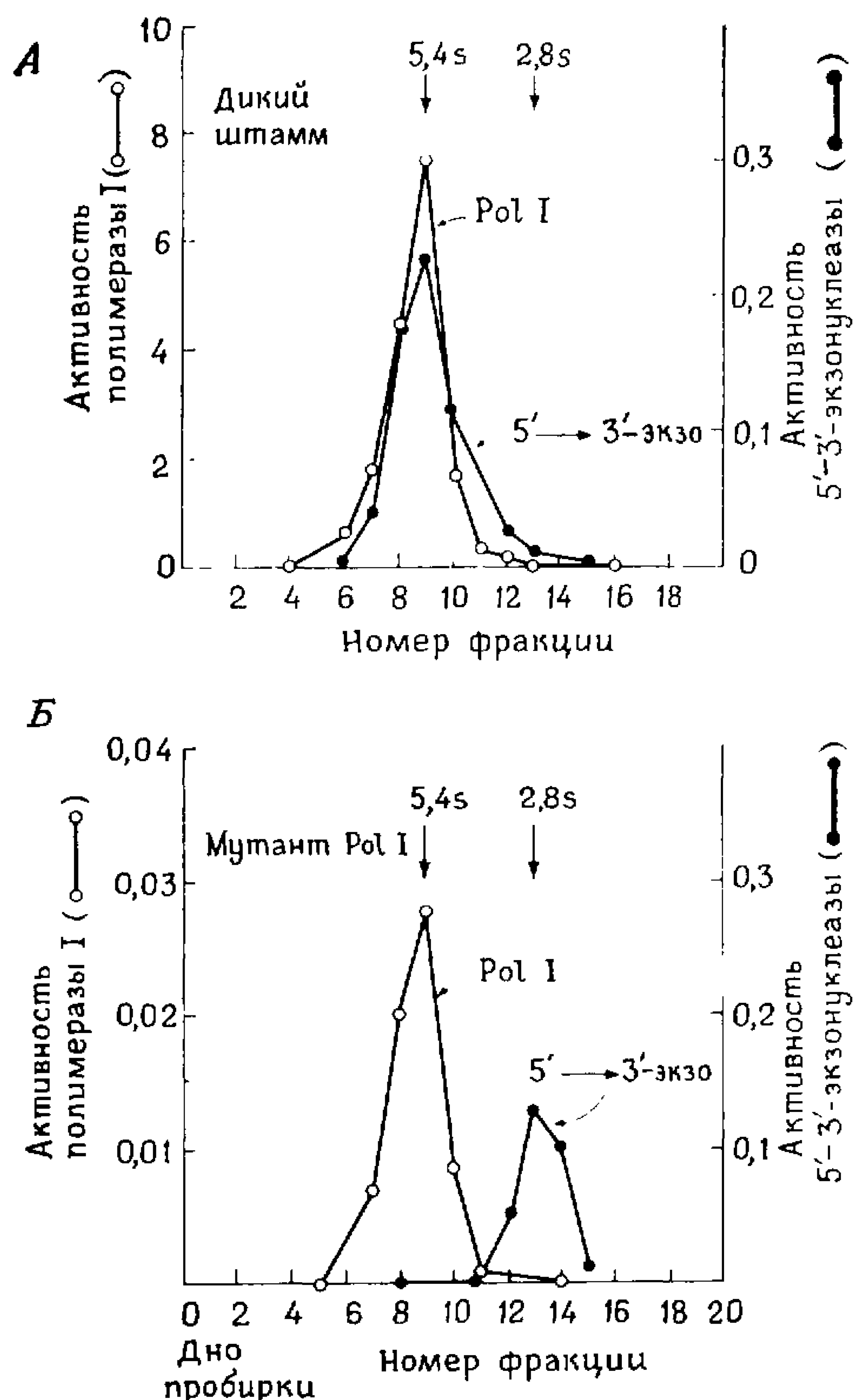


РИС. 11-26.

Зональная седиментация ДНК-полимеразы I *E. coli*, выделенной из дикого штамма (*А*) и из штамма, синтезирующего только фрагмент фермента (*Б*), в градиенте сахарозы 5—20%.

Фермент дикого штамма обладает двумя активностями: полимеразная активность измеряется по включению ^{32}P-нуклеотида в нерастворимое в кислоте вещество (левая ось), а 5′—3′-экзонуклеазная — по удалению ^{32}P из полинуклеотида, меченного по концевой фосфатной группе ^{32}P (правая ось). В части *А* обе активности седиментируют совместно, так как они соответствуют одному белку. В части *Б* мутантный фермент обладает только 0,4% полимеразной активности, однако более медленно движущийся фрагмент сохраняет 5′—3′-экзонуклеазную активность. [*Lehman I. R., Chien J.*, J. Biol. Chem., 248, 7717—7723 (1973)].

в 2 раза меньше истинного. Для определения количества атомов ^{32}P на интактную молекулу ДНК реакционную смесь можно проанализировать путем седиментации через градиент сахарозы (рис. 11-27). Рисунок показывает (причем такая ситуация часто встречается на практике), что значительная часть радиоактивности практически не седиментирует, оставаясь в верхнем слое гра-

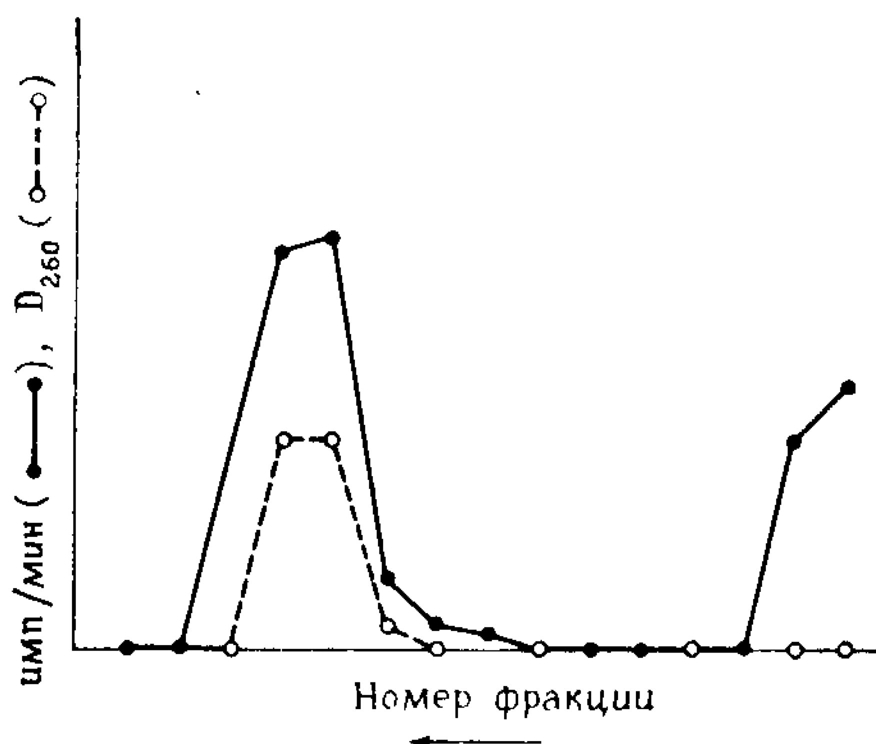


РИС. 11-27.

Седиментограмма ДНК фага T7, меченной по концевой группе ^{32}P с использованием полинуклеотидкиназы T4.

D_{260} соответствует общей концентрации ДНК, активность ^{32}P позволяет определить число концевых групп. Заметьте, что зона у верха градиента не поглощает при 260 нм. Следовательно, в этом участке концентрация ДНК очень низка, а активность соответствует включению метки в мелкие фрагменты.

диента. Однако главный пик отвечает интактным молекулам, поэтому из соотношения количества ^{32}P и концентрации ДНК в этом пике можно рассчитать значение *M*.

Пример 11-К. *Частичная очистка осмотически нестабильной структуры, содержащей гормон.* Из гипоталамуса крысы можно выделить гормон, носящий название вещества Р. Дороти Фрайфелдер и Сьюзен Лимен обнаружили, что гормон может выпадать в осадок из мацерированной ткани при очень малой центробежной силе, если ткань перед разрушением клеток суспендировать в 20%-ной сахарозе; в отсутствие сахарозы он не седиментирует даже при очень большой центробежной силе. Отсюда было сделано предположение, что гормон содержится в осмотически нестабильных частицах. Седиментация этих частиц через градиент сахарозы (от 5 до 20%) оказалась невозможной, так как слой образца немедленно опускался на дно. Применить градиент от 25 до 70% было нельзя, так как частицы, по-видимому, разрушались при высокой осмотической силе. Для решения этой проблемы был получен градиент из 20%-ной сахарозы в H_2O и 20%-ной сахарозы в D_2O. Полученный таким образом градиент достаточно стабилен за счет того, что D_2O на 11% плотнее H_2O, а постоянная концентрация сахарозы поддерживает необходимую силу осмоса. Седиментация через такой градиент дала возможность получить частично очищенные частицы.

Зональная седиментация в самогенерирующемся градиенте плотности

Часто бывает желательно проводить зональную седиментацию на аналитической ультрацентрифуге с использованием ультрафиолетовой абсорбционной оптики. Этот метод предпочтителен в случае, когда имеется очень маленький образец, который нельзя метить радиоактивными изотопами и анализировать химическими или ферментативными методами. Чтобы избежать затруднений, связанных с получением градиента плотности в ячейках аналитической ультрацентрифуги, Джером Виноград разработал методику зонального центрифугирования без предварительной подготовки градиента.

Как отмечалось выше, при нанесении образца на более плотный раствор без предварительно созданного градиента граница будет разрушаться под действием конвективных токов. Виноград заметил, что если приготовить образец в растворе очень низкой плотности, то вследствие диффузии растворенного вещества, используемого для увеличения плотности более плотного раствора со временем, перепад плотности, генерируемый на поверхности раздела, будет медленно распространяться вдоль центрифужной пробирки, образуя пологий градиент. Под границей, образуемой распространяющимся градиентом, градиент отсутствует и имеет место конвекция. Однако в распространяющемся градиенте и над ним происходит стабилизация, предотвращающая конвекцию. Ясно, что в течение седиментации материала градиент будет двигаться перед ним, поэтому материал постоянно будет находиться в градиенте плотности, что дает возможность нормального хода седиментации. Кроме того, если растворенное вещество в более плотном растворе обладает особо высокой плотностью (для этого чаще всего используют CsCl), то соль будет также в незначительной степени седиментировать с образованием дополнительного стабилизирующего градиента. Этот метод известен под названием *зональной седиментации* в самогенерирующемся градиенте плотности.

На рис. 11-28 изображена конструкция ячейки центрифуги, которая используется в этом методе. В ячейку предварительно помещают раствор с высокой плотностью (обычно 2 М CsCl), после чего отверстие для ввода образца заполняют раствором изучаемого вещества. Вскоре после разгона центрифуги материал протекает через царапину на поверхности ячейки и наносится тонким слоем поверх более плотного раствора. При увеличении скорости вращения происходит седиментация. Пока скорость не

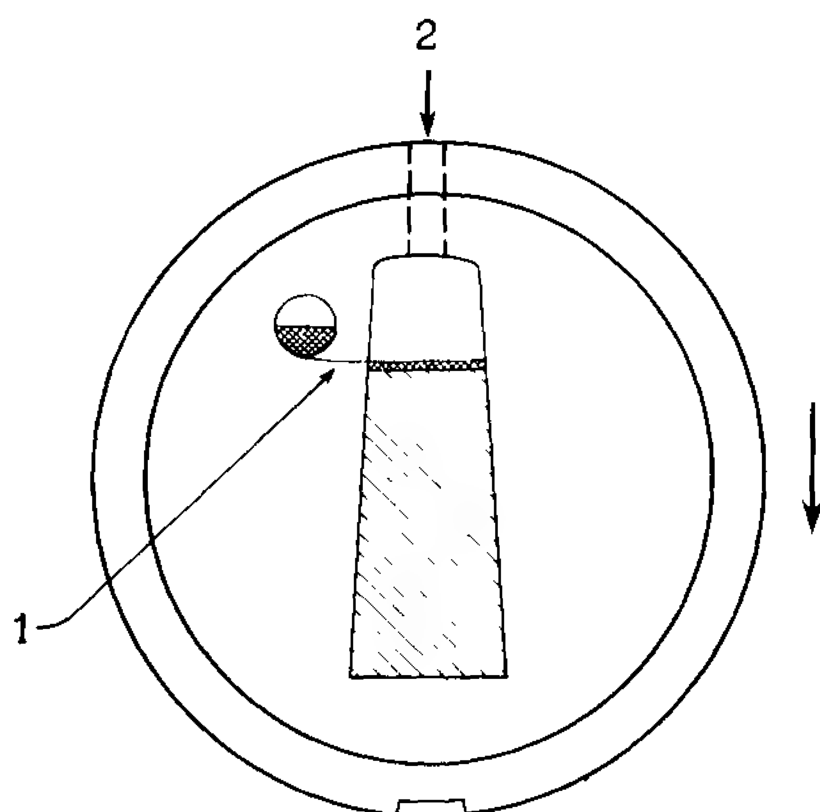


РИС. **11-28.**

Вид сверху на сердечник, служащий для образования зон.

Растворитель (заштрихованная площадь) вводится в сектор через отверстие для заполнения. Образец помещается в круглую полость. При ускорении образец течет по царапине и образует слой на поверхности растворителя. На рисунке изображен процесс получения слоя образца. Заметим, что раствор образца течет только по царапине, так как сердечник всей своей поверхностью плотно соприкасается с окном. (Конструкция разработана Джеромом Виноградом, Калифорнийский технологический институт.) *2* — отверстие для заполнения; *1* — царапина.

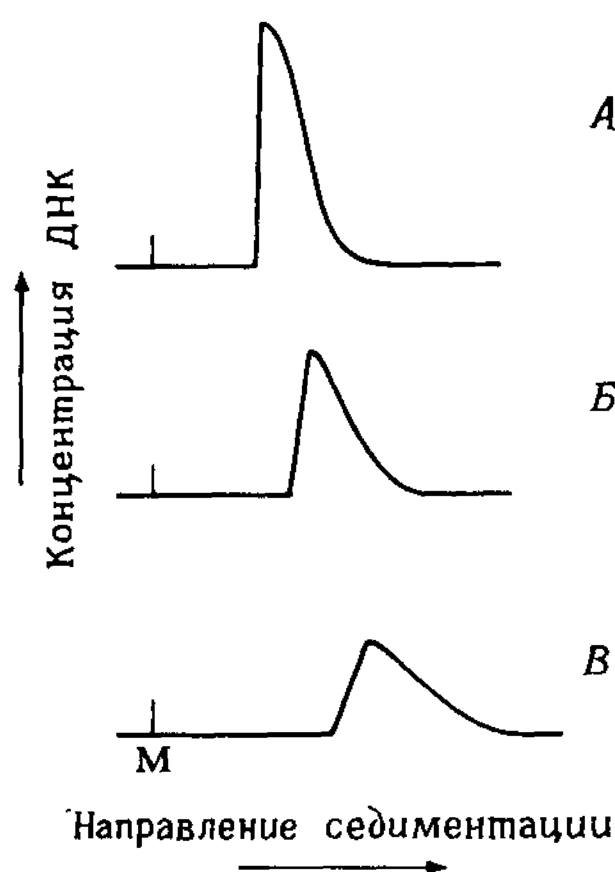


РИС. **11-29.**

Седиментация двухцепочечной ДНК фага Т7 в ячейке, образующей зону (рис. 11-28). Время центрифугирования увеличивается от *А* к *Б*, буквой М обозначен мениск

слишком высока, зона не нарушается. Рис. 11-29 показывает обычные типы распределения концентрации (полученные при измерении ультрафиолетового поглощения) ДНК при седиментации через концентрированный раствор CsCl. Обратите внимание, что из-за более быстрого движения материала в направлении движения граница становится асимметричной. Это легко объясняет-

ся концентрационной зависимостью; вещество на передней стороне границы находится в меньшей концентрации и поэтому движется быстрее. Тыльная сторона границы выглядит более четкой, поскольку любая молекула, которая диффундирует в направлении к центру, находится в области с нулевой концентрацией и в результате седиментирует с максимальной скоростью. Действительно, из формы границы можно получить полное соотношение между s и концентрацией для данной молекулы.

Зональное центрифугирование оказывается полезным при определении наличия очень маленьких количеств *быстро седиментирующего* вещества в образце В стандартном методе скоростной седиментации быстро осаждающийся компонент движется через седиментирующий медленно, при этом скорость его движения замедляется за счет эффекта Джонстона — Огстона; это часто не позволяет его заметить. В зональной седиментации такие небольшие фракции седиментируют в области нулевой концентрации, поэтому их легко можно идентифицировать.

Метод зональной седиментации быстро становится популярным в аналитическом центрифугировании ДНК, однако для анализа белков он еще не получил распространения.

Седиментация ДНК при щелочных значениях pH

При высоких значениях pH ДНК денатурирует. Таким образом, денатурированную ДНК можно исследовать в щелочном градиенте сахарозы (т. е. 5—20% сахарозы в 0,1—0,3 М NaOH) *.

Седиментация через щелочной раствор имеет два важных использования: для идентификации одноцепочечных разрывов в двухцепочечной ДНК и для проведения различий между разными конформациями ДНК. В основе идентификации одноцепочечных разрывов лежит следующее соображение: если двухцепочечные молекулы, не содержащие разрывов, разделяются в щелочи, то

* Единственное осложнение при использовании этого метода заключается в том, что сахароза при высоких концентрациях проявляет заметные буферные свойства в диапазоне pH 10—11. Кроме того, ее буферная емкость существенно возрастает с понижением температуры. Таким образом, для приготовления щелочных градиентов сахарозы нельзя применять разбавление буфера с pH 12,5 с последующим прибавлением сахарозы. Чтобы обеспечить денатурацию, pH доводят до нужного значения после добавления сахарозы, причем это необходимо делать при той же температуре, при которой будет проводиться седиментация. Применение 0,3 *М* NaOH позволяет решить эту проблему. Все щелочные растворы сахарозы должны содержать хелатирующий агент, такой, как ЭДТА (этилендиаминтетраацетат натрия), для предотвращения катализируемого ионами металлов гидролиза фосфодиэфирных связей.

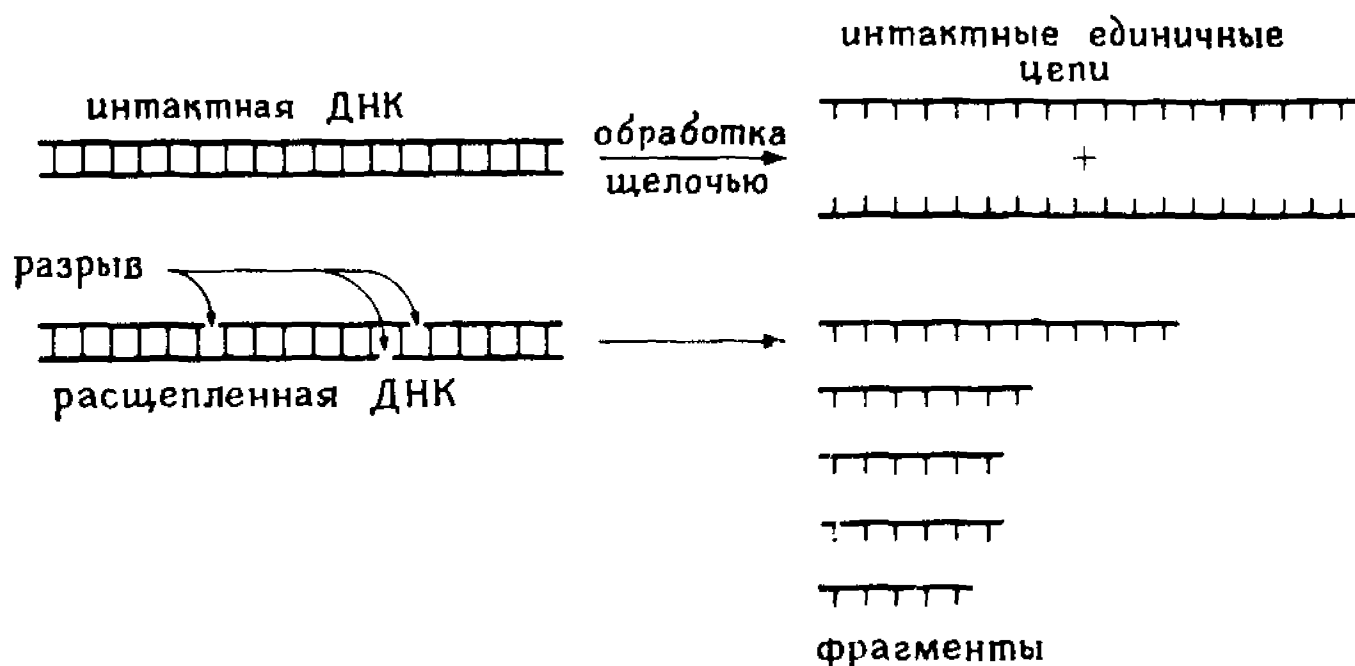


РИС. 11-30.
Результаты денатурирования интактной и расщепленной двухцепочечной ДНК.

две цепи имеют одинаковый размер и поэтому одинаковые значения *s* (рис. 11-30). Однако при наличии разрыва (предположим, что имеется только один разрыв в одной из цепей) получается одна интактная цепь и два фрагмента различного размера, т. е. три значения *s*. Если разрывы происходят случайно, образуется набор фрагментов всевозможных размеров. Это рассуждение, несомненно, можно распространить на случай одного или более разрывов в одной или обеих цепях. Главным здесь является возможность идентифицировать одноцепочечный разрыв, поскольку при наличии его фрагменты будут осаждаться в щелочи медленнее, чем интактная цепь.

Выбор между различными конформациями ДНК можно сделать на основании следующих соображений. Как говорилось в гл. 1, молекулы ДНК могут быть линейными, в виде незамкнутого кольца (как минимум, один одноцепочечный разрыв) и в виде ковалентного кольца (не содержит разрывов). Возможны и комбинации этих типов. Так, например, две кольцевые молекулы могут быть связаны подобно звеньям цепи; такие структуры называются *катенанами*. Каждая из таких структур обладает характерным значением *s* (рис. 11-31), хотя различия и не слишком велики. Рассмотрим, что произойдет с каждой из возможных структур в щелочи (рис. 11-32). Линейная молекула будет диссоциировать на две отдельные цепи; кольцо с одноцепочечным разрывом разделится на две части — одну линейную и одну одноцепочечную кольцевую молекулы. Однако два одноцепочечных кольца, входящие в кольцевую ковалентную молекулу, не смогут разделиться, так как они переплетены друг с другом. Это приводит к тому, что в щелочи денатурированные ковалентные кольцевые молекулы сжимаются (коллапсируют) с образованием пере-

		$s_{20,в}$
А	○	26
Б	○	34
В		23
Г		37
Д		51
Е		51

РИС. **11-31.**

Коэффициенты седиментации различных кольцевых структур ДНК, выделенной из митохондрий лейкоцитов человека [*Hudson B., Clayton D. A., Vinograd J. I.,* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **33**, 435—442 (1968)].

А — мономерное незамкнутое кольцо; *Б* — димерное незамкнутое кольцо; *В* — катенановый димер; *Г* — мономерная суперспираль; *Д* — димерная суперспираль; *Е* — катенановая димерная суперспираль.

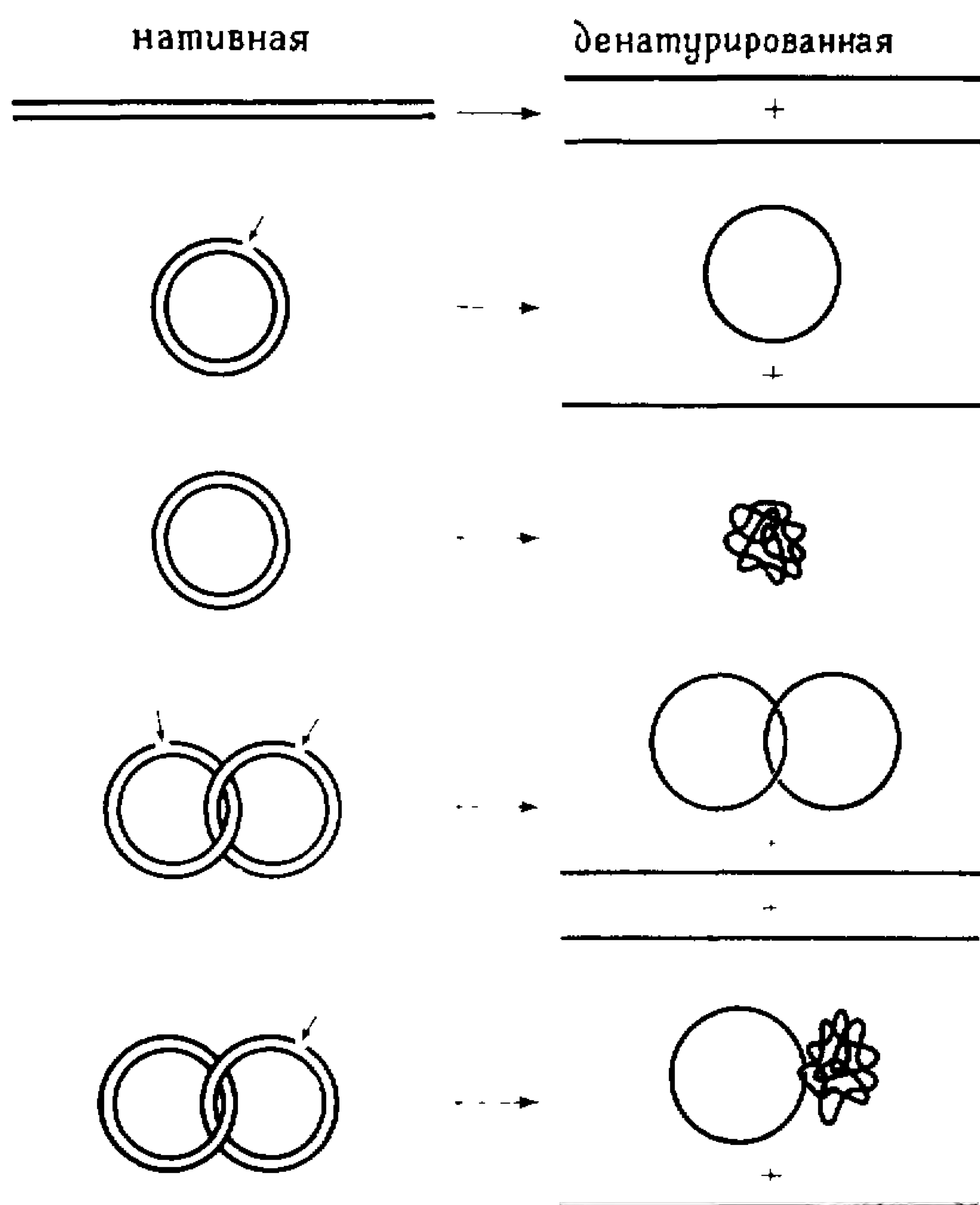


РИС. **11-32.**

Продукты денатурирования различных форм ДНК.

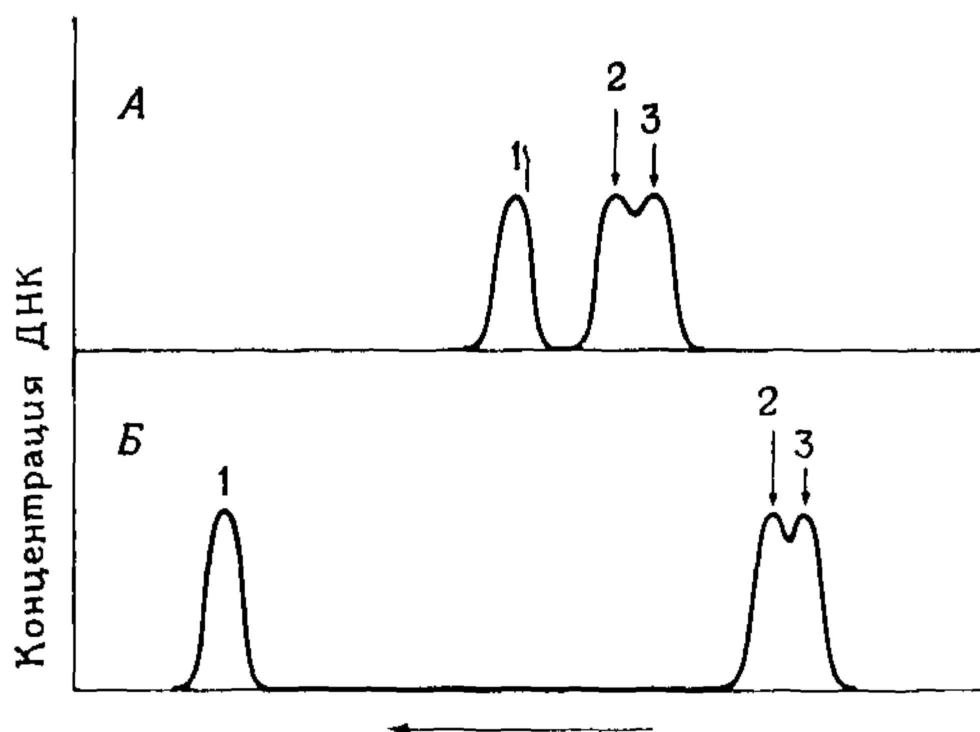


РИС. 11-33.

Разделение ковалентных колец (*1*), незамкнутых колец (*2*) и линейных молекул (*3*) путем седиментации в нейтральной среде (нативная ДНК) (*А*) или в щелочи (денатурированная ДНК) (*Б*).

Время центрифугирования в части *Б* в два раза меньше, чем в части *А*. Обратите внимание на лучшее разделение ковалентных колец в щелочной среде.

путанной компактной структуры. Поскольку молекулярная масса при этом не изменяется и молекула становится более компактной, значение *s* сильно возрастает. На рис. 11-33 изображены два гипотетических результата седиментации смеси трех форм при центрифугировании в нейтральной и щелочной сахарозе. Полезным свойством ковалентных колец служит их необычная разделяемость, что использовано в приведенных ниже примерах.

Пример 11-Л. *Идентификация небольших фрагментов вновь синтезируемой ДНК: фрагменты Оказаки.* При выращивании бактерии *E. coli* в среде, содержащей ^{3}H-тимидин, в течение многих поколений синтезируемая ДНК будет включать ^{3}H. При выделении этой ДНК и седиментации при нейтральном pH установлено, что значение *s* указывает на ее высокую молекулярную массу. Однако при седиментации этой же ДНК в щелочном градиенте сахарозы оказалось, что небольшая часть ДНК седиментирует очень медленно (рис. 11-34, *А*). Из этого было сделано предположение, что часть двухцепочечных молекул ДНК содержит близко расположенные одноцепочечные разрывы. Если нерадиоактивные клетки выращивать в течение всего лишь 5 с (0,2% поколения) в радиоактивной среде, затем отделять и анализировать в щелочном градиенте сахарозы, оказывается, что бóльшая часть радиоактивности (т. е. вся ДНК, синтезированная за период 5 с) содержится во фракции с очень малым *s* (рис. 11-34, *Б*). Синтезированная за это время ДНК должна иметь множество близко расположенных одноцепочечных разрывов. Если клетки после выращивания в течение 5 с в радиоактивной среде перенести вновь в нерадиоактивную и выращивать в ней в течение 10 мин ($^1/_4$ поколения), седиментационный анализ в щелочном градиенте сахарозы показывает, что вся радиоактивность находится во фракции с высоким *s* (рис. 11-34, *В*), т. е. «старая» ДНК не содержит одноцепочечных разрывов. Эти

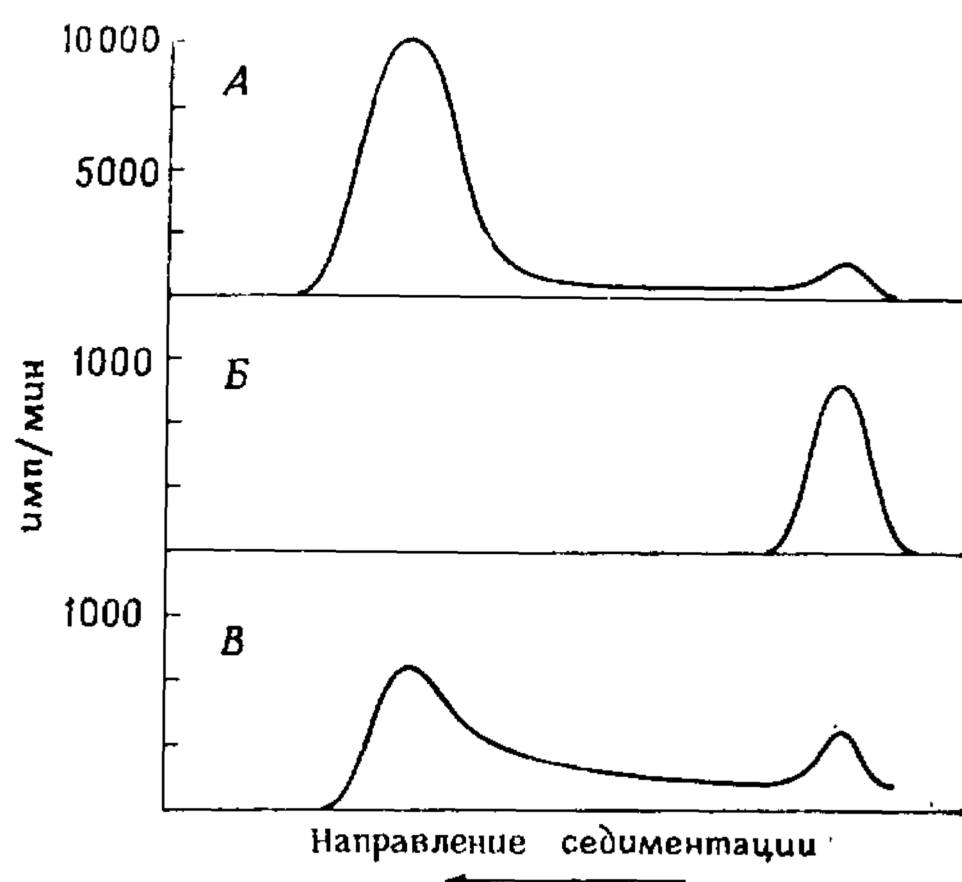


РИС. 11-34.

Обнаружение коротких одноцепочечных фрагментов ДНК в *E. coli* с помощью седиментации в щелочной сахарозе.

А — бактерию выращивали в течение многих поколений в присутствии ^{3}H-тимидина; *Б* — метка вводилась в бактерию коротким импульсом; *В* — за коротким импульсом введения метки следовал период роста в отсутствие метки (детали приведены в тексте). Обратите внимание на различия в шкале значений радиоактивности между частью *А* и частями *Б* и *В* (данные получены в лаборатории университета Брандейс).

простые результаты привели к выводу, что ДНК синтезируется вначале в виде небольших фрагментов, которые затем объединяются в крупные единицы.

Пример 11-М. *Обнаружение радиационных повреждений в бактериальной ДНК.* При обработке меченной ^{3}H-тимидином бактерии ферментом лизоцимом, который разрушает часть клеточной стенки бактерии, и быстром нанесении полученного препарата на щелочной градиент сахарозы лизис бактерии будет завершаться при действии щелочи, а ДНК при этом будет денатурировать. Последующее центрифугирование показывает, что большая часть ДНК имеет очень высокий s (рис. 11-35). Если же перед лизисом клетки подвергнуть рентгеновскому облучению, значение s существенно понижается, указывая тем самым на то, что облучение приводит к одноцепочечным разрывам. Из эмпирического соотношения между s и M можно рассчитать число одноцепочечных разрывов и сравнить его с дозой радиации. Этот подход позволяет установить связь между разрывами цепей и убивающим действием рентгеновских лучей.

Пример 11-Н. *Определение структуры ДНК фактора* F *E. coli.* Фактор F *E. coli* ответствен за способность мужского штамма переносить его ДНК к женскому штамму. Физическими метода-

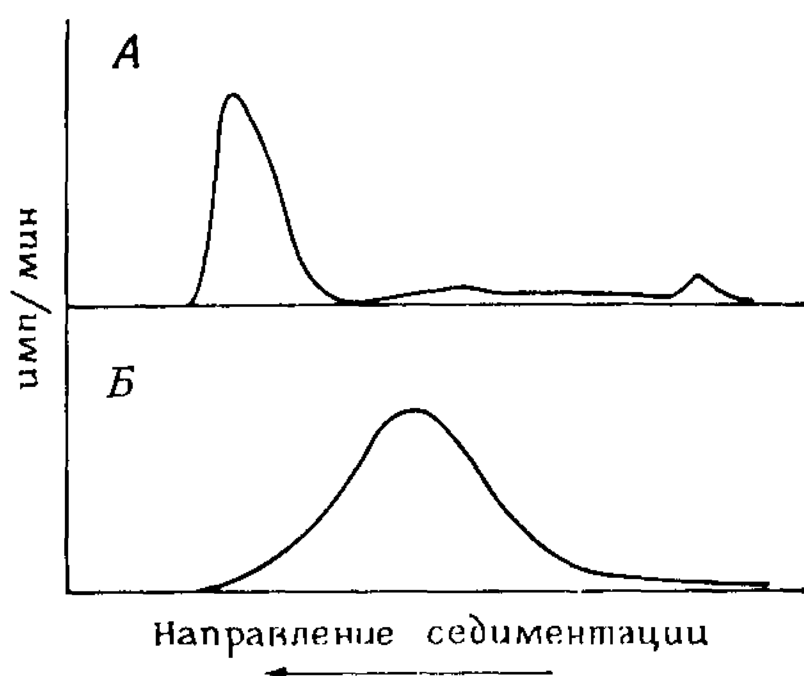


РИС. 11-35.

Обнаружение одноцепочечных разрывов в ДНК *E. coli* методом Ричарда Мак-Грата и Р. В. Вильямса [Nature, 212, 534—535 (1966)].

А — необлученная бактерия; *Б* — бактерия, облученная рентгеновскими лучами. Клетки обрабатывали лизоцимом и наносили слоем на щелочной градиент сахарозы. Лизис и высвобождение ДНК происходит в слое (данные получены в лаборатории университета Брандейс).

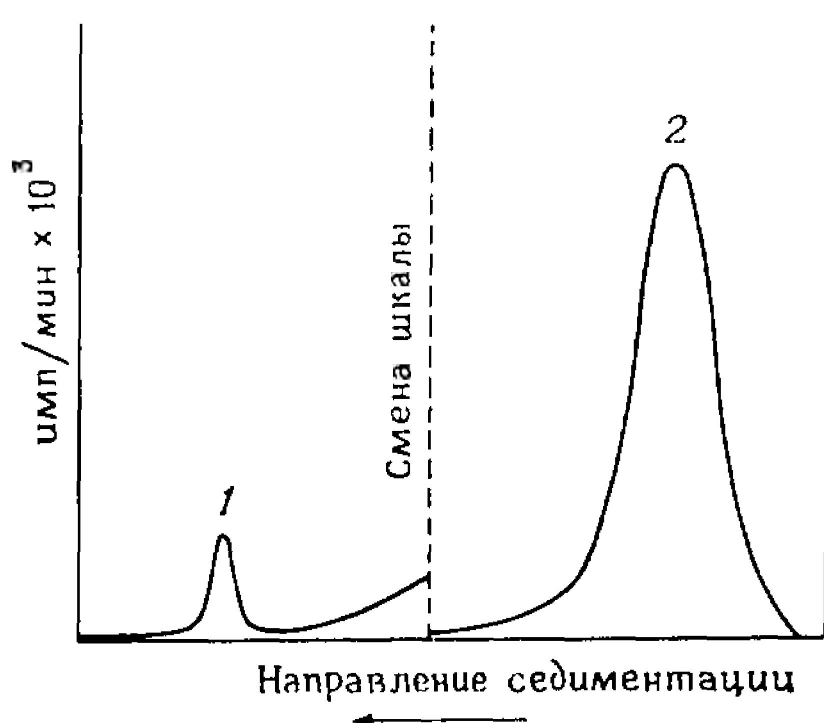


РИС. 11-36.

Обнаружение ковалентных колец ДНК фактора F *E. coli*.

Бактерию выращивали в присутствии ^{3}Н-тимидина, подвергали лизису и седиментировали через щелочной градиент сахарозы. Сверхспирали фактора F составляют приблизительно 1% от общего количества ДНК, однако они легко отделяются вследствие высокого значения *s* в щелочи. *1* — фактор F; *2* — хромосома.

ми анализа было установлено, что этот фактор является частью ДНК, отличающейся от ДНК хромосомы и составляющей всего лишь 1% от молекулярной массы ДНК хромосомы. При выращивании мужского штамма *E. coli* в течение многих поколений в среде, содержащей ^{3}Н-тимидин, метка включается во всю ДНК. Если эти клетки затем подвергнуть лизису, после чего проанализировать ДНК методом седиментации в щелочной сахарозе, можно заметить небольшую (примерно 1% от общего количества ДНК) фракцию, которая седиментирует заметно быстрее (рис. 11-36), причем ее значение *s* больше, чем для интактной хромосомальной ДНК *E. coli*. Такая быстрая седиментация обычно указывает на ковалентную кольцевую структуру. Ранее упоминалось о свойстве ковалентных колец, содержащих одноцепочечный разрыв, превращаться в незамкнутые кольца, что позволяет разделить цепи в щелочи; в свою очередь, это приводит к более медленной седиментации. Хорошо известны некоторые агенты, вызывающие одноцепочечные разрывы; их применение приводит к исчезновению пика быстро седиментирующего компонента. Кинетика этого процесса имеет первый порядок, что ука-

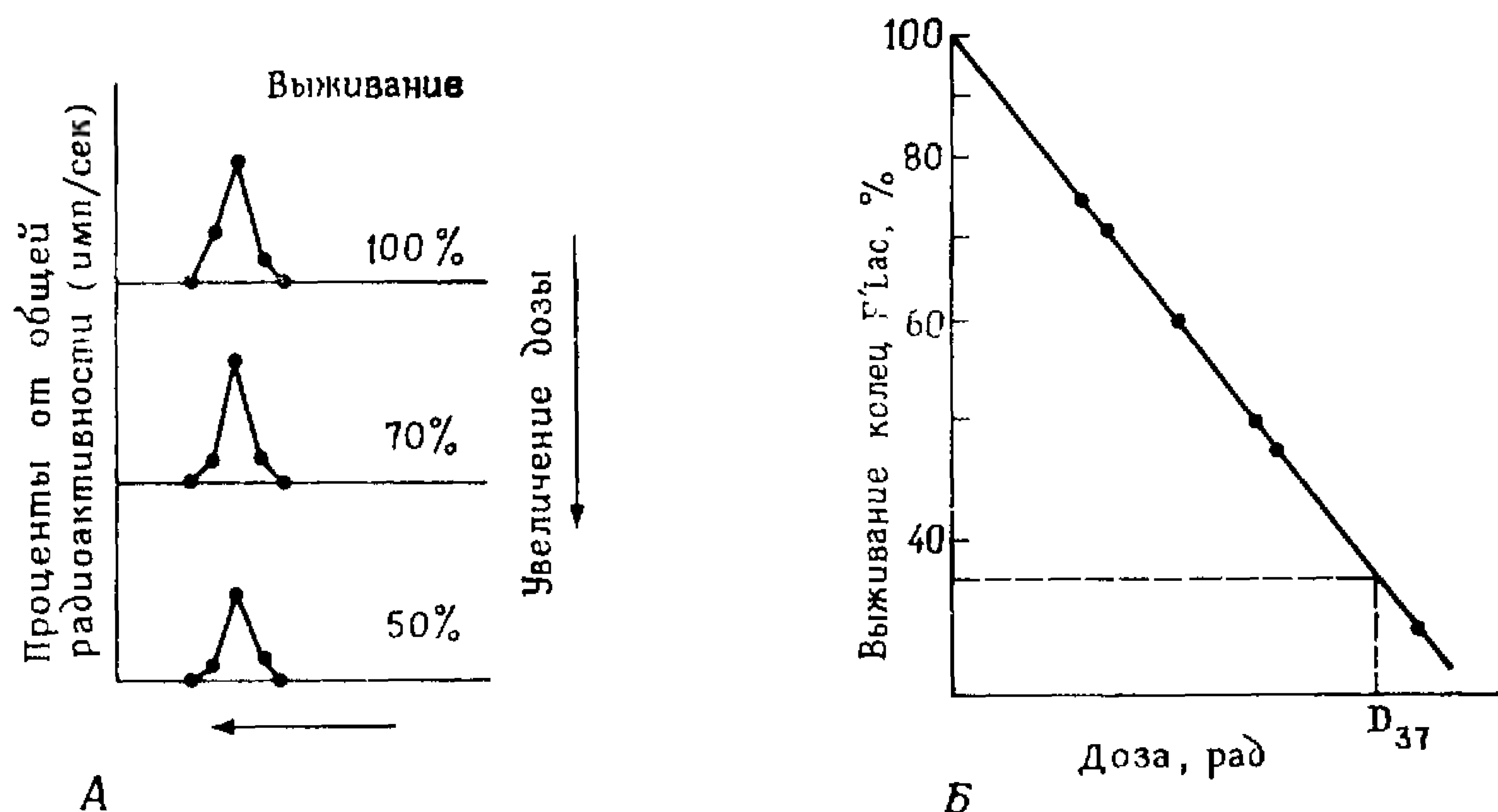


РИС. 11-37.

Влияние рентгеновского облучения на *E. coli*, содержащую F′Lac.

Часть *А* показывает часть градиента сахарозы, содержащую ковалентные кольца F′Lac для трех различных доз облучения. Часть *Б* показывает полулогарифмическую зависимость «выживания» ковалентных колец F′Lac; «выживание» определяли из анализа градиента, как в части *А*. D_{37} — доза, при которой «выживание» составляет 1/e, т. е. 37%. При этой дозе происходит в среднем один одноцепочечный разрыв на молекулу F′Lac.

зывает на то, что причиной исчезновения пика является одноцепочечный разрыв. Таким образом, можно заключить, что F представляет собой ковалентное кольцо. Из эмпирического соотношения между *s* и *M* для ковалентных колец в щелочи можно получить значение *M*.

Пример 11-О. *Измерение скорости образования одноцепочечных разрывов с помощью измерения количества «выживающих» ковалентных колец.* В примере 11-М одноцепочечные разрывы обнаруживались при расщеплении линейных молекул ДНК. Это же можно проделать более точно путем анализа ковалентных колец. В бактерию *E. coli*, содержащую половой фактор F′Lac, вводили радиоактивную метку, облучали рентгеновскими лучами, а затем седиментировали в условиях, описанных в примере 11-Н. Количество «выживающих» ковалентных колец F′Lac как функцию полученной дозы радиации измеряли при помощи сравнения количества радиоактивности в быстро седиментирующей фракции. График зависимости логарифма «выживания» от дозы приведен на рис. 11-37. Поскольку график представляет собой прямую, доза, при которой «выживание» составляет $1/e$, отвечает в среднем получению одного одноцепочечного разрыва на ковалентное кольцо. Значение *M* для F′Lac известно, поэтому легко рассчитать число разрывов на единицу молекулярной массы в зависимости от дозы.

Определение молекулярной массы методом седиментации — диффузии

В начале этой главы было показано, что

$$s = m\,(1 - \bar{v}\rho)/f, \tag{8}$$

где f — коэффициент трения. Значение коэффициента трения предсказать трудно, однако можно воспользоваться тем, что он связан с коэффициентом диффузии D соотношением

$$D = RT/f, \tag{9}$$

где R — газовая постоянная, а T — абсолютная температура. После преобразования этих уравнений приходим к следующему:

$$m = sRT/D(1 - \bar{v}\rho). \tag{10}$$

Отсюда можно рассчитать значение m после измерения значений s и D и экстраполяции обоих до нулевой концентрации. Коэффициенты s и D либо измеряют в одном растворителе и при равной температуре (наилучший метод), либо полученные значения приводят к воде при 20°С. Последний метод более надежен.

Измерение коэффициента диффузии не представляет труда при использовании современных приборов; это будет обсуждаться в гл. 12. Следует, однако, заметить, что для очень больших вытянутых молекул, таких, как ДНК, значение D настолько мало, что точное его измерение невозможно.

Измерение молекулярной массы методом седиментационного равновесия

Метод седиментационного равновесия дает возможность прямого определения m, поскольку здесь нет необходимости определять D. Метод заключается в том, что центрифугирование проводится при относительно низкой скорости, при которой седиментация молекулы настолько медленна, что уравновешивается диффузией; т. е. тенденции центробежной силы к понижению концентрации у мениска и увеличению ее у дна ячейки противопоставлена диффузия, стремящаяся к поддержанию одинаковой концентрации во всем объеме ячейки. При равновесии, конечно, концентрация у мениска меньше, чем у дна, однако эти значения остаются посто-

янными. Состояние равновесия описывается хорошо известным распределением Больцмана, которое в данном случае выглядит следующим образом:

$$\frac{c_1}{c_2} = e^{-(E_1-E_2)/kT}, \qquad (11)$$

где c_1 и c_2 — концентрации молекул растворенного вещества на расстояниях r_1 и r_2 оси вращения, где молекулы обладают потенциальными энергиями E_1 и E_2, f — константа Больцмана. Разность потенциальных энергий E_1—E_2 представляет собой работу, необходимую для перемещения молекулы с массой m от r_2 до r_1, т. е. *против* силового поля, или

$$E_1 - E_2 = -\int_{r_2}^{r_1} m(1-\bar{v}\rho)\,\omega^2 r\,dr = \frac{1}{2} m(1-\bar{v}\rho)\,\omega^2(r_2^2 - r_1^2). \qquad (12)$$

Объединяя уравнения (11) и (12) и заменяя k на газовую постоянную R таким образом, что единицы m (которые теперь становятся M) приобретают размерность единиц молекулярной массы (дальтоны) вместо граммов, получают следующее уравнение, которое можно использовать для расчета M непосредственно из данных центрифугирования:

$$M = \frac{2RT}{(1-\bar{v}\rho)\,\omega^2} \ln\frac{c(r)}{c(a)}\;\frac{1}{r^2 - a^2}, \qquad (13)$$

где $c(r)$ — концентрация растворенного вещества на расстоянии r от оси вращения, а a — расстояние от мениска до оси вращения. График зависимости $\ln c(r)$ от r^2 представляет собой прямую линию, которая и используется для определения M (рис. 11-38).

Приведенный вывод основан на допущении, что система содержит только два компонента и что изменения плотности за счет изменений c и давления* пренебрежимо малы. При малых скоростях влиянием давления действительно можно пренебречь. Также невелики будут и изменения ρ в случае низких концентраций. При этом следует иметь в виду, что концентрация противоиона должна поддерживаться достаточно низкой, чтобы можно было говорить о двухкомпонентной системе. Может возникнуть вопрос, почему вообще речь заходит о противоионе? Это следует обязательно учитывать, поскольку обычно растворенные молекулы обладают зарядом, что приводит к образованию градиента электрического потенциала при распределении таких заряженных молекул. Противоион эффективно нейтрализует этот

* Давление возникает за счет действия поля центробежной силы.

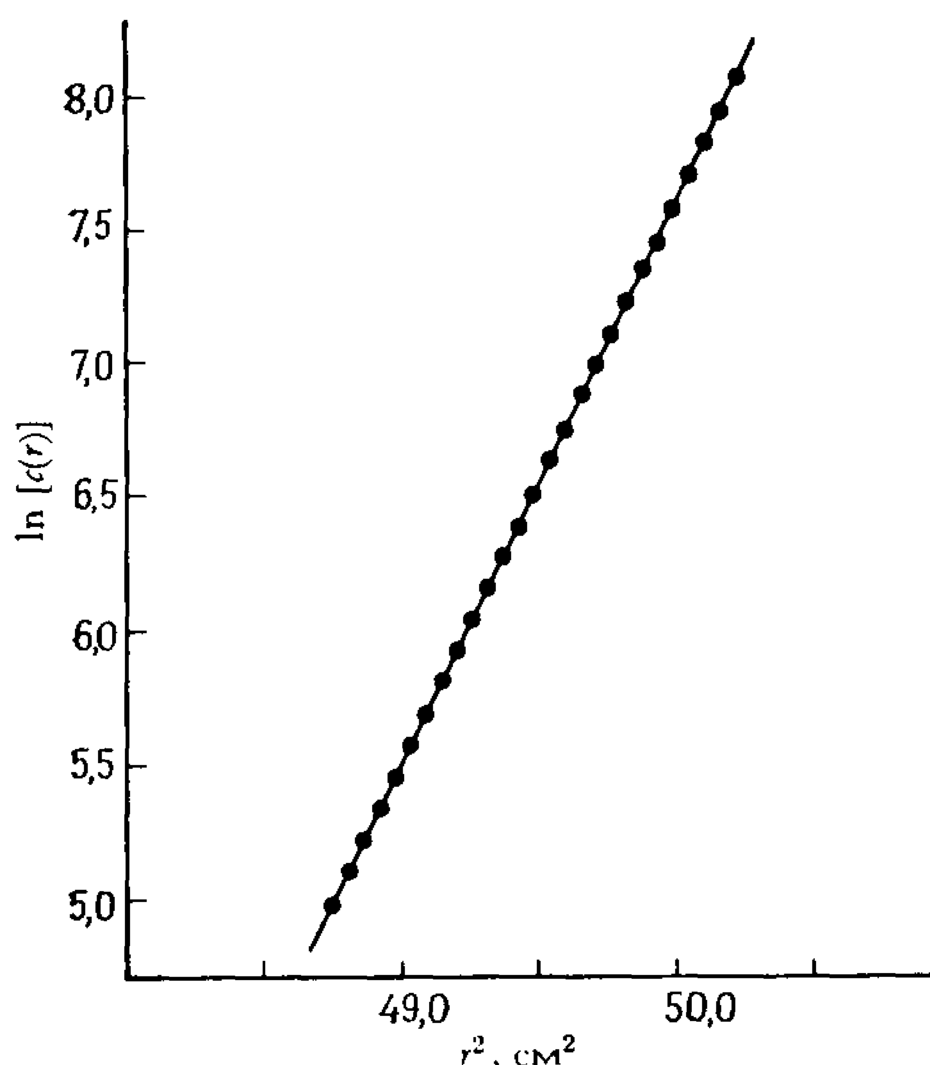


РИС. 11-38.

Данные седиментационного равновесия для альбумина бычьей сыворотки в 6 М хлориде гуанидиния при 27 690 об/мин и 20°С. Начальная концентрация белка равна 650 мкг/мл.

градиент, позволяя тем самым избежать серьезных затруднений, возникающих при отсутствии возможности такой нейтрализации.

К преимуществам метода равновесия следует отнести: 1) наличие прочной теоретической основы, 2) возможность работы с небольшими количествами вещества и 3) очень высокую точность измерений (ошибка не превышает 1%). Незначительным неудобством является большое время достижения равновесия (16—24 ч).

Определение молекулярной массы методом приближения к равновесию (метод Арчибальда)

В методе приближения к равновесию (часто называют методом Арчибальда по имени его изобретателя), как и в методе равновесной седиментации, молекулярная масса получается прямо из распределения концентрации, однако для этого требуется значительно меньшее время. Это бывает очень важно при исследовании нестабильных молекул.

Метод равновесия был первоначально разработан в связи с тем, что математические уравнения, описывающие транспорт молекул в поле центробежной силы, могли быть разрешены для условий равновесия, когда в любой точке ячейки центрифуги от-

сутствует какой-либо поток. Метод Арчибальда использует тот факт, что в любое время (не только при равновесии) либо у мениска, либо у дна ячейки отсутствует перемещение вещества. Хотя ясно, что перед достижением равновесия изучаемые макромолекулы совершают некоторое движение от мениска и накапливаются у дна, это утверждение просто означает, что вещество не выходит за пределы ячейки и не попадает в нее извне. Математическим следствием из этого является возможность определения M с помощью измерения обеднения макромолекулами мениска и накопления их у дна ячейки в любой момент времени. Для этого используют следующие уравнения:

$$\frac{(\partial c/\partial r)_\text{а}}{\omega^2 r_\text{а}} = -\frac{M_\text{а}(1-\bar{v}\rho)(c_0-c_\text{а})}{RT} + \frac{M_\text{а}(1-\bar{v}\rho)c_0}{RT} \qquad (14)$$

и

$$\frac{(\partial c/\partial r)_\text{в}}{\omega^2 r_\text{в}} = -\frac{M_\text{в}(1-\bar{v}\rho)(c_0-c_\text{в})}{RT} + \frac{M_\text{в}(1-\bar{v}\rho)c_0}{RT}, \qquad (15)$$

где c — концентрация макромолекул на расстоянии r, c_0 — начальная концентрация, r — расстояние от оси вращения, при котором измерено зничение c, а индексы «а» и «в» соответствуют мениску и дну соответственно.

Преимуществом метода Арчибальда является короткий период седиментации, а главным недостатком — необходимость проведения измерений очень близко к мениску и дну ячейки, что снижает их точность.

Седиментационное равновесие в градиенте плотности

До сих пор мы рассматривали случаи, когда плотность изучаемых молекул намного превышала плотность растворителя. В этом разделе будет описан важный метод седиментационного равновесия в градиенте плотности (его разработали Мэтью Мезелсон, Франклин Шталь и Джером Виноград), в котором плотность растворителя почти такая же, как и плотность изучаемой молекулы. Этот метод требует присутствия третьего компонента (обычно соли цезия) с низкой молекулярной массой и высокой плотностью. При центрифугировании раствора соль перераспределяется [в соответствии с уравнением (13)] с достижением равновесия, образуя тем самым градиент концентрации, который имеет меньшую плотность сверху и бо́льшую — у дна пробирки, т. е. градиент плотности. Макромолекулы при этом

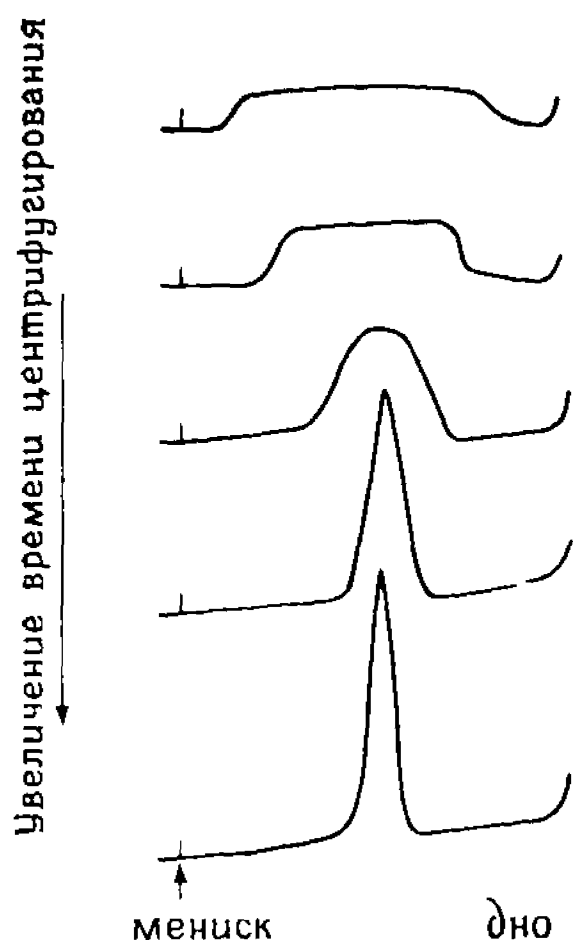


РИС. 11-39.

Движение молекул ДНК к положению равновесия при центрифугировании в градиенте плотности CsCl. Высота кривой соответствует концентрации ДНК в каждой точке ячейки. Площадь под кривой остается постоянной.

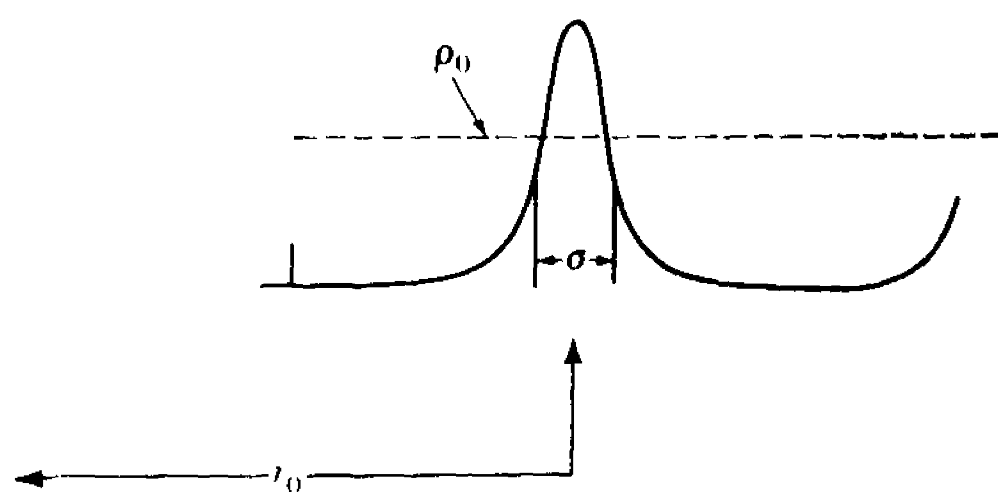


РИС. 11-40.
Параметры зоны в градиенте CsCl.

——— концентрация ДНК; — — — плотность раствора; r_0 — расстояние от центра зоны до оси вращения; ρ_0 — плотность в центре зоны; σ — ширина зоны при $1/e$ высоты.

также седиментируют, однако вещество от верха ячейки движется через градиент центробежно, а от дна — центростремительно (рис. 11-39). Этот процесс продолжается до тех пор, пока макромолекулы не образуют зону в том месте градиента, где плотность макромолекул равна плотности раствора (рис. 11-40). (В этом случае плотность макромолекул соответствует плотности раствора соли цезия в воде.) Ширина зоны определяется соотношением между центробежной силой (которая способствует сужению зоны), диффузией (уширяющей зону) и градиентом плотности (чем круче градиент, тем у́же получается зона).

В настоящее время этот метод используется почти исключительно для ДНК и бактериофагов; в ряде случаев его применяют для РНК и рибосом, однако для белков он используется редко. Приведенное здесь обсуждение относится к ДНК и фагам.

Измерение молекулярной массы методом седиментационного равновесия в градиенте плотности

Теория седиментационного равновесия в градиенте плотности усложняется тем, что: 1) для создания градиента обычно применяют очень высокую концентрацию соли (5—7 *М*), что не позволяет рассматривать систему как двухкомпонентную, 2) положительно и отрицательно заряженные ионы соли распределяются в объеме неодинаково, так как они обладают разными молекулярными массами и коэффициентами диффузии, а это приводит к созданию градиента электрического потенциала, и 3) скорости центрифугирования настолько высоки, что уже нельзя пренебрегать влиянием давления. По этой причине данный метод обычно не используется для определения молекулярных масс, однако, так как его можно применять, если данные обрабатываются соответствующим образом, приведем краткое его описание.

Если игнорировать факт наличия трехкомпонентной системы, можно вывести следующее уравнение:

$$M = \frac{8RT\rho_0}{\sigma^2 (d\rho/dr)\, \omega^2 r}, \qquad (16)$$

где ρ_0 — плотность в центре зоны, σ — ширина зоны при $1/e$ высоты, $d\rho/dr$ —градиент плотности, ω — угловая скорость (рад/с) r_0 — расстояние от центра зоны до центра вращения. Неоднократно было замечено, что это уравнение дает заниженные значения M (обычно примерно в 2 раза), причем ошибка возрастает с увеличением M. Считалось, что это является следствием пунктов 1 и 2, приведенных выше. Однако Карл Шмид и Джон Херст показали, что причиной этого служат неточности при измерении $d\rho/dr$ и концентрационные эффекты макромолекул в зоне. Проблема измерения $d\rho/dr$ была решена путем определения разделения двух полос, которые различаются по плотности, путем изотопного замещения (например, ^{14}N на ^{15}N или ^{12}C на ^{13}C) в случае данной молекулы, плотность которой известна. После этого можно использовать уравнение (16) для получения точного значения M с помощью экстраполяции до нулевой концентрации с использованием уравнения

$$\ln M = \ln M(c_0) + kc_0, \qquad (17)$$

где $M(c_0)$ — значение М, измеренное при c_0 (концентрация в центре зоны), k — константа, а c_0 рассчитывают из

$$c_0 = \frac{0,20c_i L}{\sigma}, \qquad (18)$$

где c_i — начальная концентрация (перед центрифугированием), L — длина столба жидкости, а σ — определяется из уравнения (16).

Читатель должен с большой осторожностью относиться ко всем измерениям молекулярной массы ДНК, выполненным методом равновесного центрифугирования в градиенте плотности до 1969 г., когда Шмид и Херст опубликовали свою работу. Однако в настоящее время этот метод и прямое измерение длины молекулы с помощью электронной микроскопии являются, вероятно, наиболее надежными способами определения молекулярной массы ДНК.

Все приведенные рассуждения справедливы только для материалов, которые гомогенны с точки зрения плотности. Гетерогенность по плотности обязательно будет приводить к уширению зоны за счет перекрывания множества близко расположенных зон. В результате получится искусственно завышенное значение σ, что повлечет за собой заниженное значение молекулярной массы.

Определение плотности путем седиментации в градиенте плотности

Огромным достоинством равновесного центрифугирования в градиенте плотности является возможность разделения веществ в соответствии с их плотностью. Например, ДНК, содержащую изотоп ^{15}N, можно отделить от ^{14}N-ДНК. При седиментации до достижения равновесия в плотном растворе CsCl различие в плотности на 0,014 г/см^3 приводит к разделению зон ^{14}N- и ^{15}N-ДНК на 0,5 мм в стандартной ячейке центрифуги при 40 000 об/мин. Другие изотопы позволяют достичь еще большего разрешения, что показано в табл. 11-1.

Ценность возможности разделения молекул ДНК на основании различий в плотности лучше всего видна из первого примера его использования Мэтью Мезельсоном и Франклином Шталем (метод был специально разработан для проведения этого эксперимента).

Пример. 11-П. *Эксперимент Мезельсона — Шталя, показывающий полуконсервативный характер репликации.* Бактерию в течение многих поколений выращивали в среде, содержащей ^{15}N, после чего клетки переносили в среду, содержащую ^{14}N, и выра-

ТАБЛИЦА 11-1

Увеличение плотности в растворе CsCl для ДНК, содержащей различные изотопы или замещенные основания

Изотоп *	Увеличение плотности, г/см³
^{15}N (100%)	0,016
^{13}C (100%)	0,049
^{13}C (60%)	0,030
^{2}H (95%)	0,056
^{15}N, ^{2}H (95%, 95%)	0,072
^{15}N, ^{13}C (95%, 60%)	0,046
Замещенное основание 5-бромурацил (100%)	0,119

* Число в скобках означает процент замещения нормального изотопа.

щивали еще в течение двух поколений. Через различные промежутки времени из культуры выделяли образцы ДНК и анализировали в градиенте плотности CsCl. При росте бактерии плотность выделяемой ДНК вначале сдвигалась до значения, соответствующего равному содержанию обоих изотопов (она называется гибридной плотностью), а затем появлялась зона, соответствующая плотности ^{14}N-ДНК (рис. 11-41). Сдвиг плотности в зависимости от числа поколений дал ясное указание на то, что ДНК имеет четное число субъединиц и репликация происходит полуконсервативно (т. е. интактными остаются единичные цепи, но не двойные).

Приведем и другие пути использования изотопной метки для изучения репликации.

Пример 11-Р. *Выделение реплицирующих молекул ДНК.* Эта элегантная процедура была использована Юн-ичи Томизава и Хидеюки Огава для выделения интактных реплицирующих молекул ДНК. Фаг λ *E. coli,* содержащий природные изотопы ^{1}H и ^{14}N, использовали для инфицирования бактерий в питательной среде, содержащей ^{2}H и ^{15}N. Через короткое время инфицированные клетки отделяли. Вся бактериальная ДНК имела $^{2}H^{15}N$-плотность, однако при полной репликации λ-ДНК можно было ожидать, что плотность ее будет соответствовать плотности одной цепи с $^{2}H^{15}N$-ДНК и другой — с $^{1}H^{14}N$-ДНК, как в примере 11-П. Если же λ-ДНК реплицирует лишь частично, плотность ее в таком случае должна немного повыситься. С помощью центрифугирования ДНК, выделенной из клеток после заражения, и отделения фракций ДНК с небольшим сдвигом плотности от нереплицирующей λ-ДНК были получены частично реплицированные молекулы. При исследовании этой фракции методом

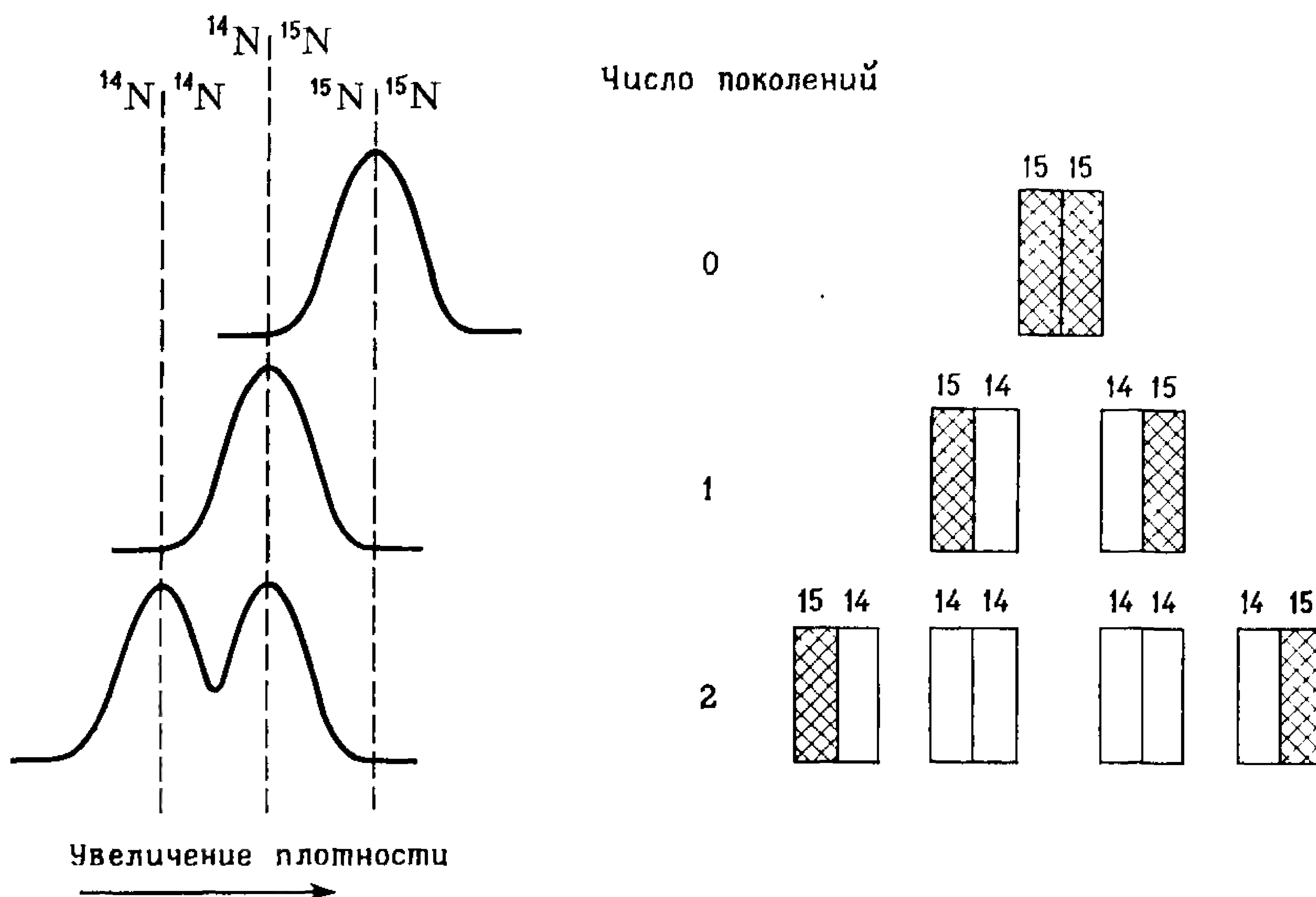


РИС. 11-41.

Типичные данные, полученные в эксперименте Мезельсона—Шталя [Proc. Nat. Acad. Sci., **44**, 671—682 (1958)].

E. coli в течение многих поколений выращивали в среде с ^{15}N, а затем мгновенно переносили в среду с ^{14}N. После одного поколения вся ДНК имела гибридную плотность. До первого поколения не было замечено ДНК с плотностью, меньше гибридной, поскольку во время выделения хромосома расщепляется приблизительно на 250 фрагментов. Справа показано состояние выделенной в различное время ДНК.

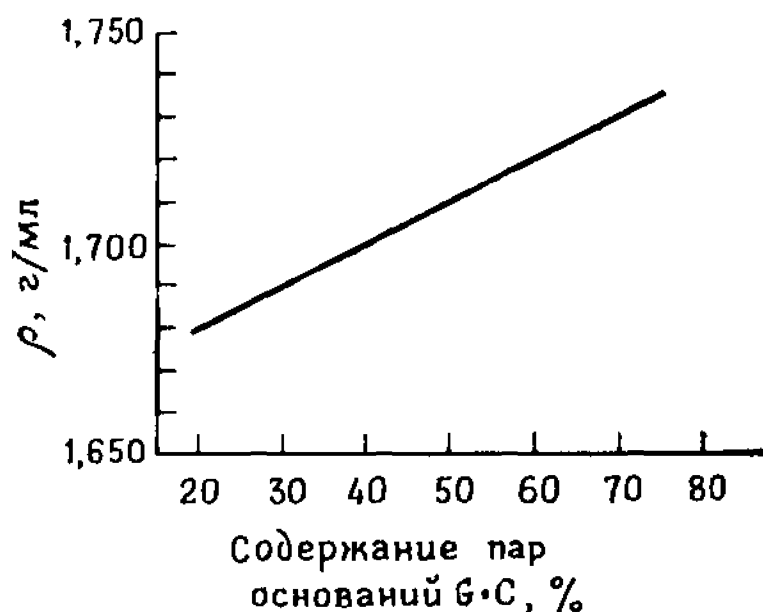


РИС. 11-42.

Плотность (ρ) ДНК в CsCl как функция содержания пар гуанин—цитозин.

График описывается уравнением $\rho = (0{,}098)(G \cdot C) + 1{,}660$ г/мл, где G·C — мольная доля G+C в нативной ДНК [*Schildkraut C. L.*, *Marmur I.*, *Doty P.*, J. Mol. Biol., 4, 430—443 (1962)].

электронной микроскопии были получены первые фотографии реплицирующей ДНК.

Различие в плотности в растворах CsCl может также зависеть от содержания в ДНК пар гуанин — цитозин (G·C) (рис. 11-42). Это свойство используется для идентификации компонентов ДНК, присутствующих в небольших количествах (ми

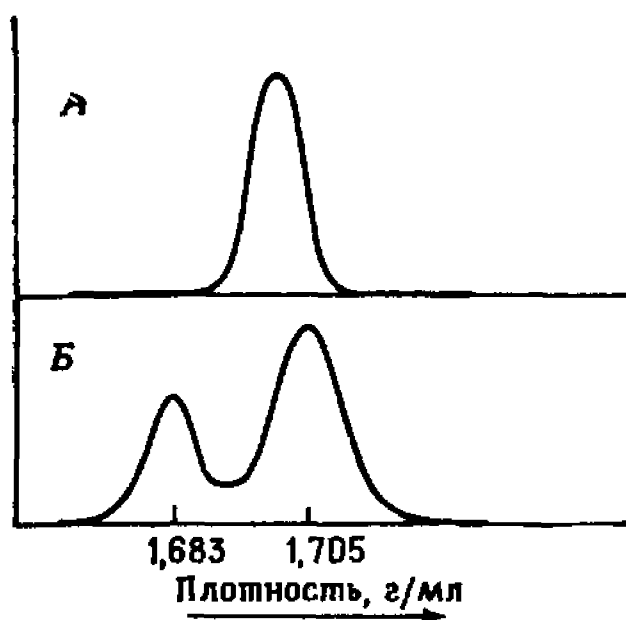


РИС. 11-43.

Фотометрическая обработка результатов равновесного центрифугирования в CsCl ДНК бактерии *E. coli* (*А*) и краба *Cancer borealis* (*Б*).

Для бактерий свойствен узкий интервал плотностей ДНК. ДНК краба состоит из двух дискретных фракций, причем одна из них обладает очень низкой плотностью. Эта минорная зона называется *сателлитной ДНК* [*Sueoka N.*, J. Mol. Biol., 3, 31—40 (1961)].

норных). Например, ДНК краба *Cancer borealis* содержит 57% G·C. Однако при анализе выделенной ДНК центрифугированием в CsCl обнаружено две зоны (рис. 11-43), причем главная фракция соответствует хромосомальной ДНК (42% G·C), а другая — минорному компоненту (3% G·C). Такая минорная зона называется *зоной-сателлитом*, причем это часто встречается в природе. В табл. 11-2 представлены данные о различных организмах, содержащих сателлитную ДНК.

ТАБЛИЦА 11-2

Некоторые сопутствующие ДНК продукты, выявленные при центрифугировании в градиенте плотности CsCl

Организм	Плотность основной полосы	Плотность сателлитной полосы	Относительное количество продукта, %
Краб (семенник)	1,700	1,681	30
Мышь	1,701	1,690	8
Пшеница (корень)	1,707	1,716	Варьирует
Помидоры	1,693	1,694 (хлоропласт)	
		1,705	Варьирует
		1,723	
Шпинат	1,697	1,694 (хлоропласт)	
		1,703	Варьирует
		1,719	
Сверчок (яичник)	1,699	1,716	Неизвестно
Зародыш цыпленка	1,698	1,718	То же
Теленок (тимус)	1,699	1,713	
		1,719	Неизвестно
Bacillus subtilis	1,701	1,714	То же
Escherichia coli 15	1,710	1,723	Варьирует

В растворах CsCl одноцепочечная ДНК имеет плотность на 0,015—0,020 г/см³ большую, чем двухцепочечная. Это свойство применяется как в аналитических целях, так и для очистки этих видов ДНК.

Пример 11-С. *Обнаружение начальной стадии заражения E. coli фагом φX174.* Фаг φX174 содержит одноцепочечную ДНК. При заражении бактерии *E. coli* φX174 с радиоактивной ДНК с последующим анализом внутриклеточной ДНК центрифугированием в CsCl было обнаружено, что плотность ДНК уменьшается до уровня двухцепочечной ДНК (результат получен в лаборатории Роберта Синшеймера). Из этого был сделан вывод о том, что ДНК X174 служит матрицей для синтеза двухцепочечной реплицирующей формы.

Плотности ДНК и белка в растворе CsCl заметно различаются и составляют примерно 1,7 и 1,3 г/см³. Таким образом, **разделение зон в CsCl** может использоваться для разделения этих молекул, например, для получения препаратов ДНК, не содержащих белка. Другим важным следствием этой разницы в плотности служит то, что плотность нуклеопротеинов, таких, как фаги и вирусы, может отражать соотношение белок — нуклеиновые кислоты. Например, фаг, содержащий белок и ДНК в равных количествах, имеет плотность $\frac{1}{2}(1,3)+\frac{1}{2}(1,7)=1,5$. На основании этого с помощью центрифугирования в CsCl Жаном Вейглем и Гретой Келленбергер были выделены мутанты бактериофага, который содержал меньшее количество ДНК за счет делеции. Так как содержание белка не уменьшается пропорционально уменьшению содержания ДНК, фаг, полученный в результате делеции, имеет меньшую плотность, чем исходный фаг. Скотт Эммонс выделил также частицы фага с избыточным содержанием ДНК, используя их более высокую плотность. Это свойство используется не только для выделения желаемых мутантов, но и для различения фагов в физических экспериментах, т. е. содержание ДНК играет роль плотностной метки. Это использовано в следующем примере.

Пример 11-Т. *Изучение рекомбинации у фага λ E. coli.* ДНК фага λ содержит центр, называемый *att*, у которого происходит рекомбинация, катализируемая ферментом интегразой. Полагают, что такой обмен включает разрыв двух молекул ДНК и последующее соединение фрагментов. Справедливость этой гипотезы была проверена путем скрещивания фага дикого типа с мутантом, который содержал две делеции (b2 и b5), что показано на рис. 11-44. Эти делеции достаточно велики для значительного воздействия на плотность фага в CsCl. В описываемом эксперименте все другие системы рекомбинации были устранены мутацией, так что активной осталась только система интегразы. Как показано

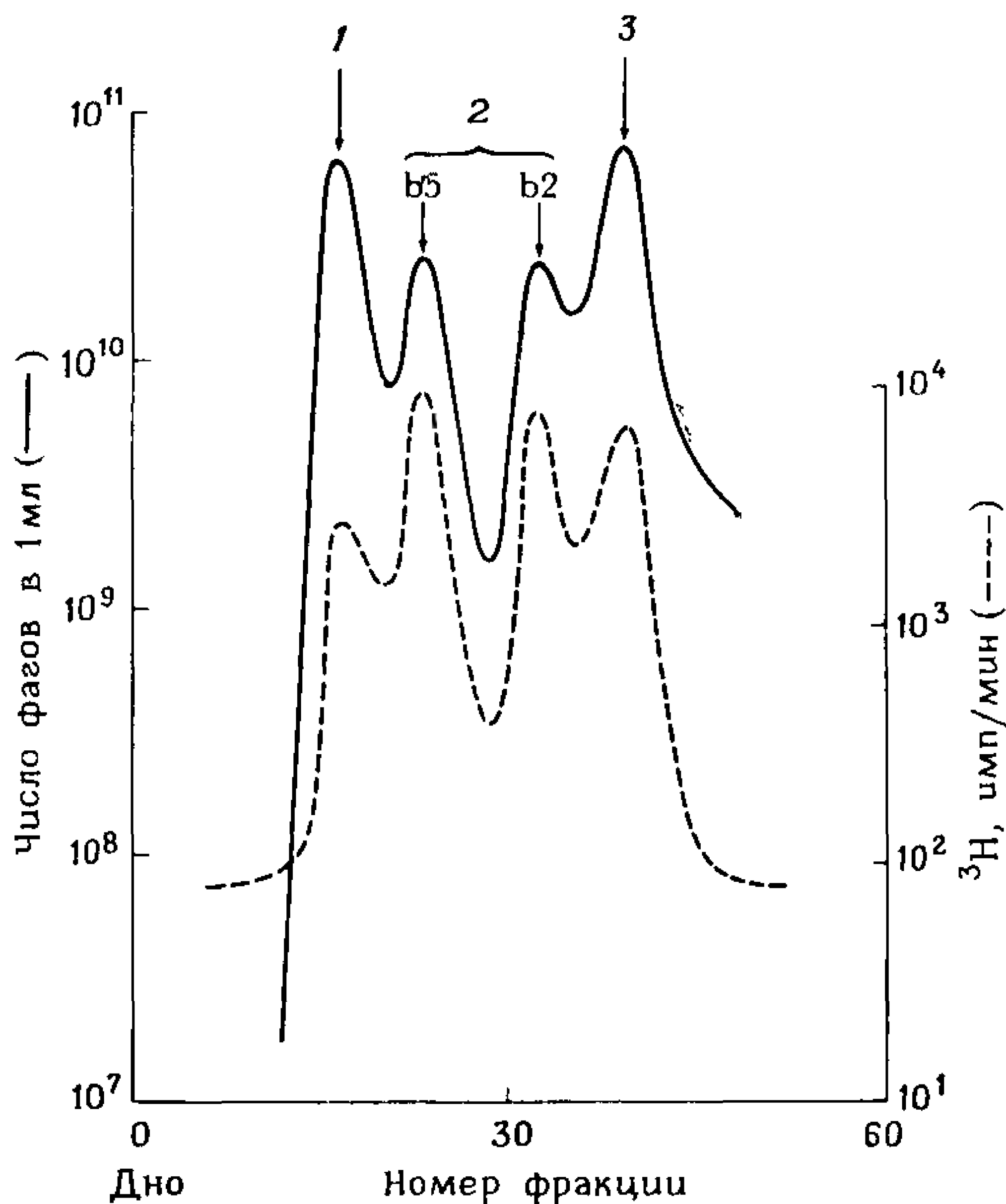


РИС. **11-44.**

Разделение родоначальных и рекомбинантных фагов центрифугированием в CsCl.

Фаг λb2b5 метили ^3H и скрещивали с нерадиоактивным фагом λb+. В результате оказалось, что ^3H связывается с рекомбинантной ДНК, а это указывает на способность родоначальной ДНК входить в состав рекомбинантной (*Kellenberger-Gujer G., Weisberg R. A.*, in "The Bacteriophage Lambda", ed. A. D. Hershey, Cold Spring Harbor Laboratory, 1971, pp. 407—415]. *1* — родоначальный b+; *2* — рекомбинанты; *3* — родоначальный b2b5.

на рис. 11-44, фаг λb2b5, меченный с помощью ^3H-тимидина, скрещивали с нерадиоактивным фагом дикого типа в *E. coli*. После лизиса инфицированных клеток освобожденные фаги анализировали в CsCl. В результате такой инфекции было получено четыре фага: b2b5 (родоначальный), $b2^+b5^+$ (родоначальный) и рекомбинантные, $b2b5^+$ и $b2^+b5$. Кроме того, они содержат либо всю родоначальную ДНК (т. е. нереплицированную), либо реплики. Хотя этот эксперимент дает значительную информацию, остается неясным, всегда ли в рекомбинантах находится первичная ДНК. Поскольку все четыре типа фагов имеют различные плотности, их легко можно различить, при этом необходимо только выяснить, находится ли ^3H в зонах, соответствующих рекомбинантам. Рис. 11-44 это подтверждает тем, что ДНК из b2b5 появляется в рекомбинантах. Если эксперимент повторить с ^3H в родоначальном $b2^+b5^+$, то снова ^3H будет найден в рекомбинантах. Это означает, что в рекомбинантах присутствует вклад ДНК обоих родоначальных фагов.

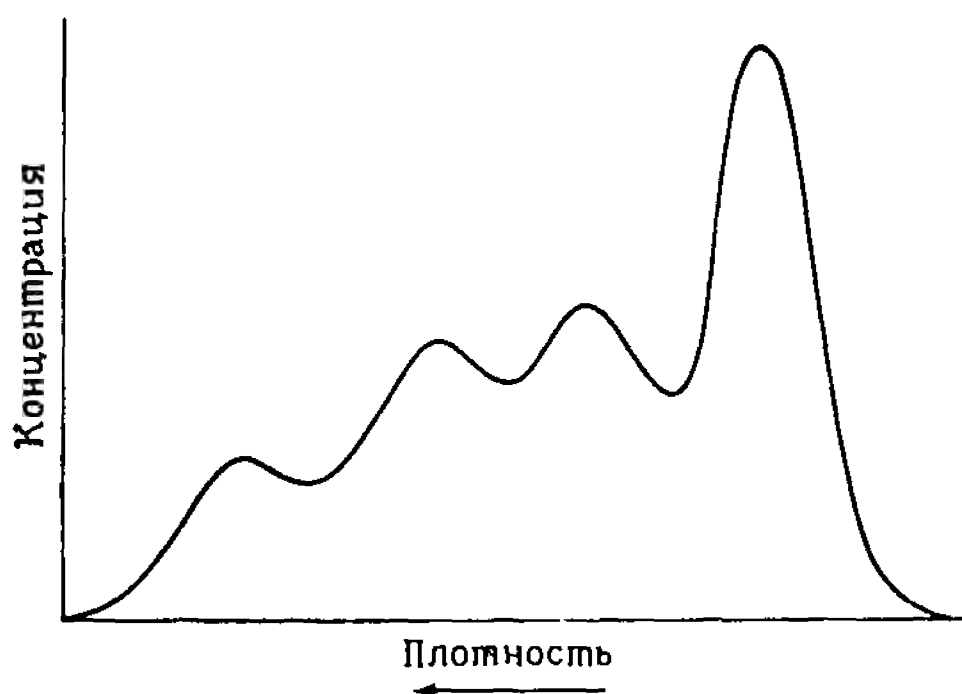


РИС. **11-45.**

Равновесная седиментация фрагментов ДНК фага λ в Cs_2SO_4, содержащем Hg^{2+}.

Различные зоны соответствуют различным участкам ДНК фага λ *E. coli*. Заметим, что ДНК с высоким содержанием G·C имеет меньшую плотность, чем ДНК с низким содержанием этих пар, в Cs_2SO_4—Hg^{2+} в противоположность CsCl. При аналогичном исследовании фрагментов, полученных из очищенных левой и правой половин и четвертей ДНК, зоны с различной плотностью были отнесены к специфическим участкам ДНК фага λ [*Skalka A. M., Hershey A. D., Burgi E. A.*, J. Mol. Biol., **34**, 1—16 (1968)].

Различия в плотностях могут быть увеличены несколькими способами:

1. *Разделение молекул ДНК в растворах Cs_2SO_4, содержащих соли Hg^{2+} или Ag^+.* Ионы Hg^{2+} обладают способностью прочно связываться с парой оснований аденин — тимин (AT). Из-за высокой плотности этого иона плотность комплекса Hg^{2+} — AT будет намного больше, чем пары G·C. При правильном выборе концентрации Hg^{2+} различия в плотности существенно возрастут. Ион Ag^+ связывается с парой G·C и используется сходным образом.

Пример 11-У. *Выделение избранных участков ДНК фага λ с помощью центрифугирования в Cs_2SO_4, содержащем Hg^{2+}.* Если ДНК фага λ *E. coli* расщепить на мелкие фрагменты путем гидродинамического фрагментирования или действием ультразвука (гл. 18), фрагменты можно разделить на группы со сходными плотностями с помощью центрифугирования в Cs_2SO_4, содержащем Hg^{2+}. Это фракционирование происходит за счет различных соотношений пар AT и G·C в различных областях λ-ДНК. Необычное разделение, достигаемое с использованием этого метода, показано на рис. 11-45.

2. *Разделение индивидуальных полинуклеотидных цепей ДНК путем образования комплексов с полирибонуклеотидами и центрифугирования в Cs_2SO_4.* Различие в плотности между отдельными полинуклеотидными цепями редко бывает достаточно

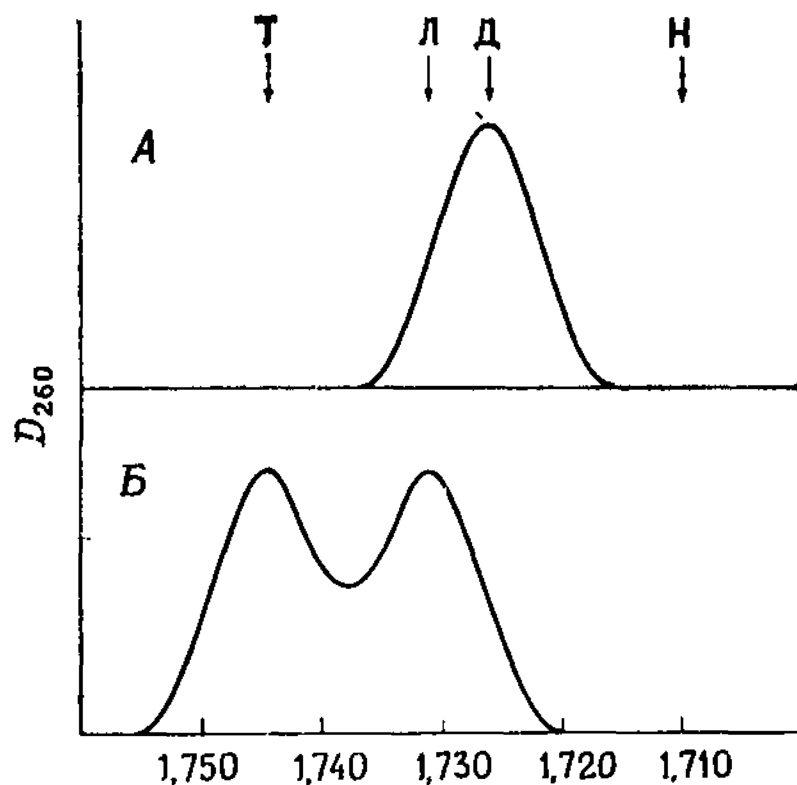


РИС. **11-46.**

Разделение комплементарных цепей ДНК фага λ при образовании комплекса с поли-ИГ (смешанный полимер инозиновой и гуаниловой кислот).

ДНК денатурировали нагреванием при 95°С. В части *А* ДНК седиментировали до равновесия в CsCl; при этом получалась одна зона в положении Д (денатурированная ДНК); Н — положение зоны нативной ДНК. В части *Б* денатурированную ДНК перед центрифугированием в CsCl смешивали с эквимолярным количеством поли-ИГ. В результате плотность повышается, так как поли-ИГ обладает большей плотностью, чем ДНК. Две цепи — Т (тяжелая) и Л (легкая) — связывают различные количества поли-ИГ, что приводит к образованию зон с различной плотностью. Эти две зоны можно разделить капельным фракционированием и отделить от поли-ИГ обработкой панкреатической РНазой, после чего получаются чистые цепи Т и Л. В ранних работах цепи Т и Л обозначали С и W по начальным буквам фамилий Крика и Уотсона. Эта широко распространенная методика разработана Вацлавом Шибальским.

большим для того, чтобы их можно было разделять в градиентах плотности. Однако эти цепи часто содержат пуриновые или пиримидиновые участки (т. е. последовательности оснований, содержащие только пурины или только пиримидины в отдельной цепи). Если молекула ДНК содержит преобладающее число пуриновых участков в одной цепи (и, следовательно, пиримидиновые участки в другой), прибавление полирибопиримидина приведет к связыванию его только с одной из цепей, но не с другой. Полирибонуклеотиды обладают очень большой плотностью в Cs_2SO_4, поэтому плотность одной из цепей ДНК существенно увеличится по сравнению с другой. После разделения полирибонуклеотид можно легко отделить путем обработки ферментом, таким, как РНаза, или расщеплением полирибонуклеотида действием щелочи. Этот метод позволяет получить в чистом виде отдельные цепи ДНК.

Пример 11-Ф. *Фракционирование двух комплементарных цепей ДНК фага λ.* В результате нагревания и денатурирования ДНК фага λ с последующим добавлением к смеси поли-ИГ (смешанный полимер инозиновой и гуаниловой кислот) методом рав-

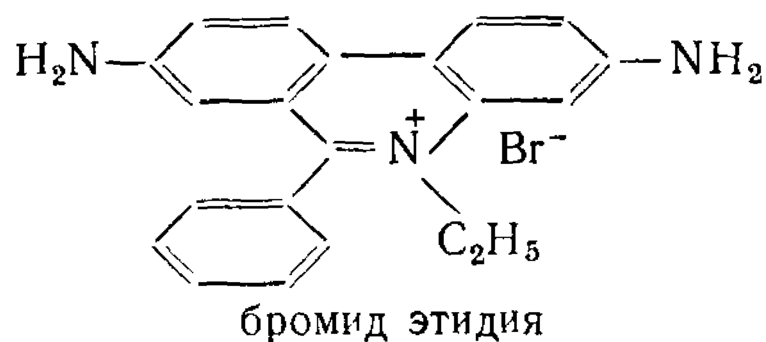


РИС. 11-47.

Химическая формула бромида этидия.

новесной седиментации в Cs_2SO_4 можно разделить две комплементарные цепи, что показано на рис. 11-46.

3. *Разделение ДНК, содержащих различное количество АТ, с помощью плотностной метки и седиментации в Cs_2SO_4.* В ряде случаев требуется разделить молекулы ДНК, которые включают плотностную метку и различаются по составу оснований. Однако если для одной ДНК содержание АТ обеспечивает плотность в CsCl, равную 1,700, а для другой — 1,715, то после введения ^{15}N и ^{14}N их плотности составляют 1,714 и 1,715, что не позволяет их разделить. Однако в растворе Cs_2SO_4 плотность не зависит от состава оснований (причины этого неизвестны). Следовательно, при седиментации в Cs_2SO_4 будут обнаруживаться только различия в изотопном составе.

4. *Отделение глюкозилированной ДНК от неглюкозилированной в градиенте Cs_2SO_4.* Некоторые молекулы ДНК фагов содержат глюкозилированные основания. Например, фаги Т2, Т4 и Т6 *E. coli* содержат 5-оксиметилцитозин вместо цитозина, причем это основание глюкозилировано. Присутствие остатков глюкозы лишь незначительно понижает плотность в CsCl (0,002 г/см^3), однако в градиенте Cs_2SO_4 это понижение значительно больше (0,020 г/см^3), причем причины этого также неизвестны. Такое различие используется для контроля синтеза глюкозилированной ДНК фага в клетке хозяина, содержащей неглюкозилированную ДНК.

5. *Отделение ковалентно замкнутых кольцевых молекул ДНК от линейной ДНК или ДНК, содержащей одноцепочечные разрывы, с помощью центрифугирования в CsCl в присутствии бромида этидия или иодида пропидия.* Бромид этидия (рис. 11-47) способен прочно связываться с ДНК в концентрированных растворах солей, в результате чего плотность ДНК понижается приблизительно на 0,15 г/см^3. Это связывание осуществляется путем вставок между парами оснований ДНК, поэтому по мере увеличения количества связываемого бромида этидия молекула ДНК все более разворачивается. Это вызвано тем, что ковалентно замкнутые кольцевые молекулы ДНК не имеют свободных кон-

цов, поэтому разворачивание вызывает скручивание всей молекулы в противоположном направлении для компенсации разворачивания. Например, при связывании достаточного количества бромида этидия для одного оборота по часовой стрелке молекула ДНК, имеющая О-образную форму, будет скручиваться против часовой стрелки, после чего приобретет форму восьмерки. Чем большее число молекул будет вставляться (интеркалировать), тем больше будет скручиваться кольцевая молекула. В конце концов скручивание достигает своего предела, после чего становится невозможным и дальнейшее разворачивание. Поэтому молекулы бромида этидия не смогут больше связываться с такой ДНК. Напротив, линейные молекулы ДНК или кольцевые молекулы с одним или более одноцепочечным разрывом не имеют топологических ограничений обратному скручиванию, поэтому они способны связывать большие количества бромида этидия. Так как плотность комплекса ДНК — бромид этидия понижается с увеличением количества связанного бромида этидия, а линейные или незамкнутые кольцевые молекулы ДНК способны связать большее его количество, чем ковалентные кольцевые, при насыщающей концентрации бромида этидия последние будут иметь большую плотность. На основании этого свойства ковалентные кольцевые молекулы можно отделить от прочих седиментацией в градиенте плотности, как показано на рис. 11-48. Еще большую разность плотностей позволяет получить иодид пропидия.

Этот метод, разработанный в лаборатории Джерома Винограда, становится одним из наиболее распространенных в биохимии и молекулярной биологии как для очистки ковалентных кольцевых молекул ДНК, так и в качестве аналитического метода.

Пример 11-X. *Доказательство роли плазмид как факторов переноса резистентности.* Многие штаммы *E. coli* проявляют одновременную устойчивость (резистентность) к некоторым антибиотикам. Эта способность передается от резистентной клетки к чувствительной, что приводит к предположению существования в резистентных клетках плазмиды, передающей ДНК. Если из резистентных и чувствительных клеток выделить ДНК и проанализировать в CsCl в присутствии бромида этидия, то можно обнаружить, что резистентные клетки содержат небольшое количество более плотного материала, который отсутствует в чувствительных клетках. Когда же чувствительные клетки становятся резистентными, это сопровождается появлением дополнительной зоны. Таким образом, информацию об устойчивости к антибиотикам несут ковалентные кольца ДНК. Из относительного количества более плотного материала можно рассчитать минималь-

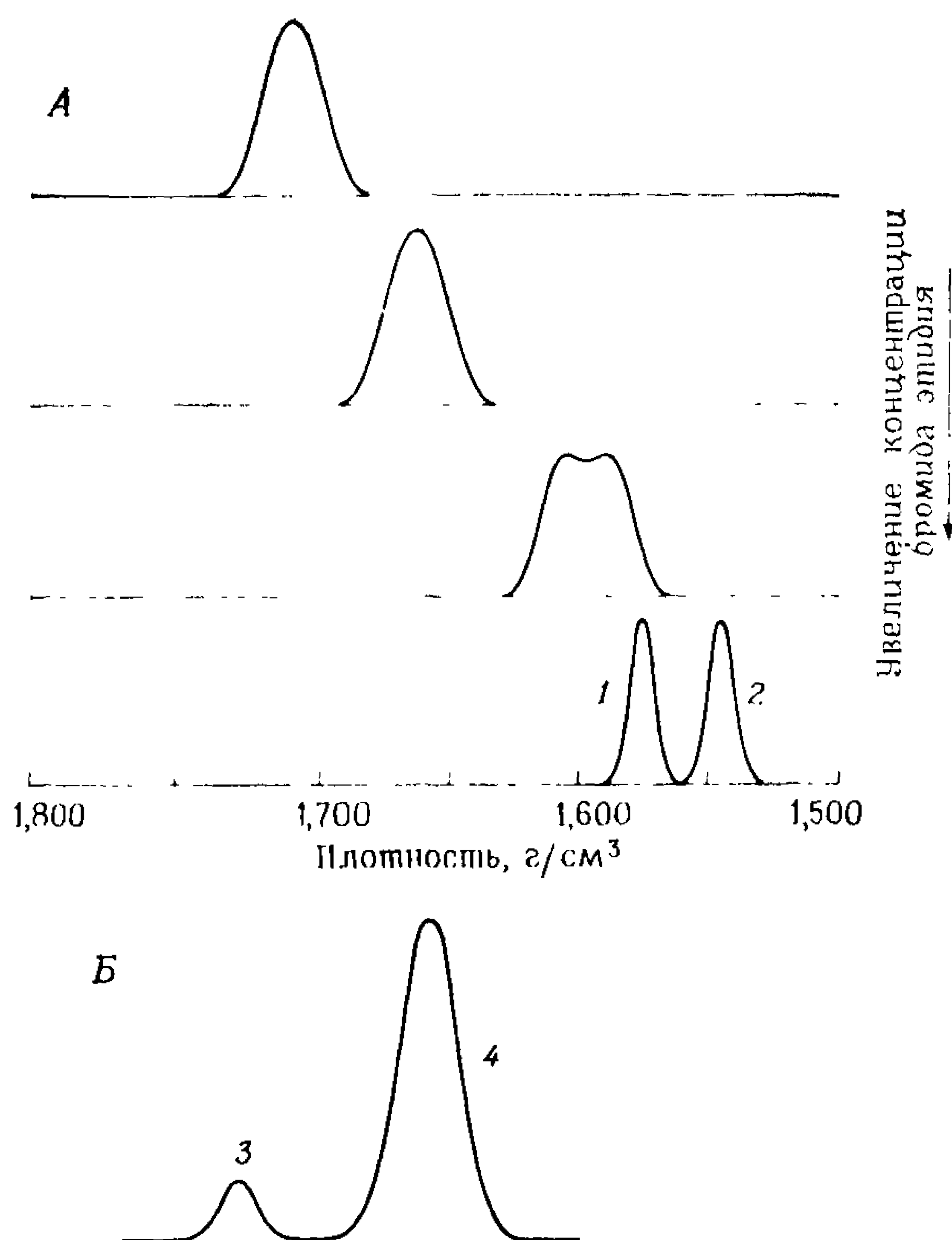


РИС. 11-48.

Влияние бромида этидия на плотность ДНК в CsCl.

В части *А* смесь равных количеств ковалентных колец (*1*) и незамкнутых колец (*2*) центрифугировали в CsCl в присутствии различных количеств бромида этидия. Плотность понижается до достижения насыщения, когда разделяются два компонента. Ковалентные кольца связывают меньшее количество бромида этидия и поэтому имеют большую плотность. В части *Б* показан результат фотометрирования седиментограммы ДНК из штамма *E. coli*, содержащего колициногенный фактор, при центрифугировании в CsCl, содержащем бромид этидия. Заметьте, что здесь имеются отличия от рис. 11-43, где сателлитная ДНК отделяется от ДНК краба, состоящие в том, что ДНК колициногенного фактора (*3*) и *E. coli* (*4*) имеют одинаковую плотность и разделяются только потому, что ДНК фактора является ковалентным кольцом.

ную долю ДНК, которая соответствует ДНК плазмиды. Эта величина будет минимальной в связи с тем, что при выделении ДНК в некоторых ковалентных кольцах могут происходить одноцепочечные разрывы, что приводит к движению этой ДНК в главной зоне. При выделении зоны плазмиды из градиента молекулы ДНК можно обнаружить под электронным микроскопом и определить их молекулярную массу. Поскольку молекулярная масса хромосомы *E. coli* известна, можно затем рассчитать минимальное число молекул плазмидной ДНК на клетку.

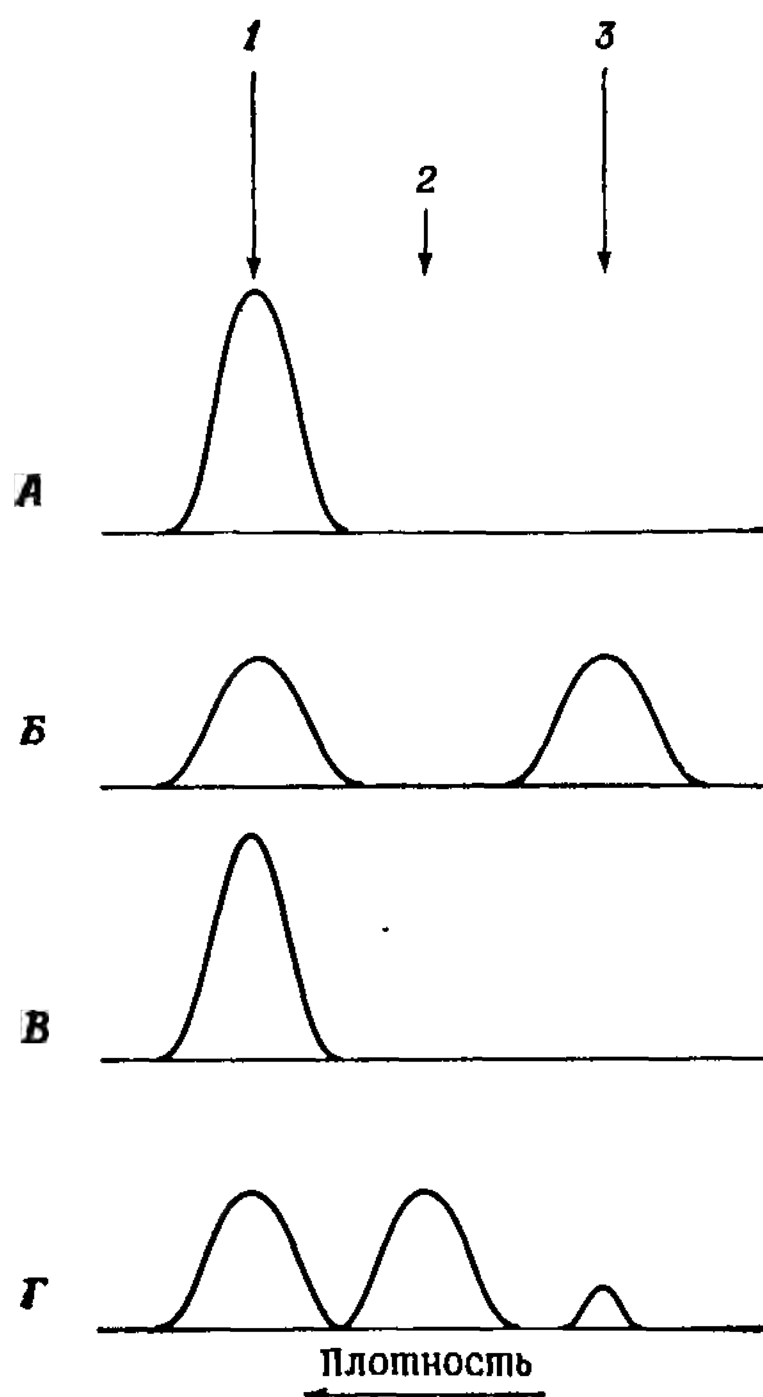


РИС. 11-49.

Метод, позволяющий различить ковалентный димер и два связанных ковалентных мономера (ковалентный катенан) с помощью центрифугирования в CsCl в присутствии бромида этидия.

Зоны ковалентного димера и катенана находятся в одном положении (*А* и *В*), однако при введении в половину молекул одноцепочечных разрывов (рентгеновским облучением или ферментативным методом при обработке ДНКазой) ковалентный димер превратится в незамкнутый (расщепленный) кольцевой димер (*Б*), а ковалентный катенан даст смесь, главным компонентом которой будет одно ковалентное кольцо, связанное с одним незамкнутым кольцом, и, кроме того, в смеси присутствует некоторое количество незамкнутых (расщепленных) колец (*Г*). *1* — ковалентные кольца; *2* — одно ковалентное кольцо + одно незамкнутое кольцо; *3* — незамкнутые кольца.

Пример 11-Ц. *Отличие димеров ДНК от катенанов.* Молекулы ДНК иногда при взаимодействии могут образовывать кольцевую структуру, молекулярная масса которой в 2 раза больше, чем мономера. Такая димерная структура может быть истинным кольцевым димером или двумя связанными мономерами (катенаном). В CsCl в присутствии бромида этидия обе эти структуры будут давать совпадающие зоны. Рассмотрим теперь, к чему приведет введение одного одноцепочечного разрыва в каждую из этих структур. Если молекула представляет собой димерное ковалентное кольцо, то в градиенте ее зона претерпит сдвиг до положения, соответствующего расщепленному кольцу (рис. 11-49). В случае

же катенана один одноцепочечный разрыв превратит одну из единиц в незамкнутое кольцо; плотность при этом будет средней между плотностями ковалентного и расщепленного колец, т. е. посередине между двумя положениями зон. Если катенан состоит из двух связанных единиц с различной молекулярной массой, то введение одноцепочечного разрыва даст две промежуточные зоны, соответствующие двум комбинациям ковалентного и незамкнутого колец.

Мэтью Мезельсон и автор этой книги использовали данный метод для того, чтобы показать, что ДНК профага вставляется в бактериальную ДНК. Штамм *E. coli*, содержащий кольцевой половой фактор с местом присоединения для фага λ, подвергали лизогенолизу. Половой фактор вместе с присоединенным профагом выделяли и комбинацией центрифугирования в щелочном градиенте сахарозы и в CsCl, содержащем бромид этидия, показали, что он обладает кольцевой структурой большей величины. Однако этот тест не давал возможности сделать выбор между двумя альтернативами, так как лизогенная форма могла представлять собой большее кольцо или катенан, состоящий из связанного полового фактора и кольца λ. После введения одноцепочечных разрывов при обработке рентгеновскими лучами кольца получали плотность, совпадающую с плотностью линейной ДНК, причем не было обнаружено зон с промежуточной плотностью. Отсюда был сделан вывод, что лизогенная форма представляет собой непрерывное кольцо.

Приложение

Определение *s*

Из уравнения (2) следует, что

$$s = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{1}{\omega^2 r} \cdot \frac{dr}{dt}.$$

где dr/dt — скорость движения частицы. Если во время $t=t_0$ граница находится на расстоянии r_0, а во время t_1 — на расстоянии r_1, то

$$\int_{t_0}^{t_1} s\,dt = \frac{1}{\omega^2} \int_{r_0}^{r_1} \frac{dr}{r},$$

или

$$s(t_1 - t_0) = \frac{1}{\omega^2}\,[\ln(r_1) - \ln(r_0)],$$

или

$$s = \frac{1}{\omega^2}\ [\text{наклон графика зависимости } \ln(r) \text{ от времени}].$$

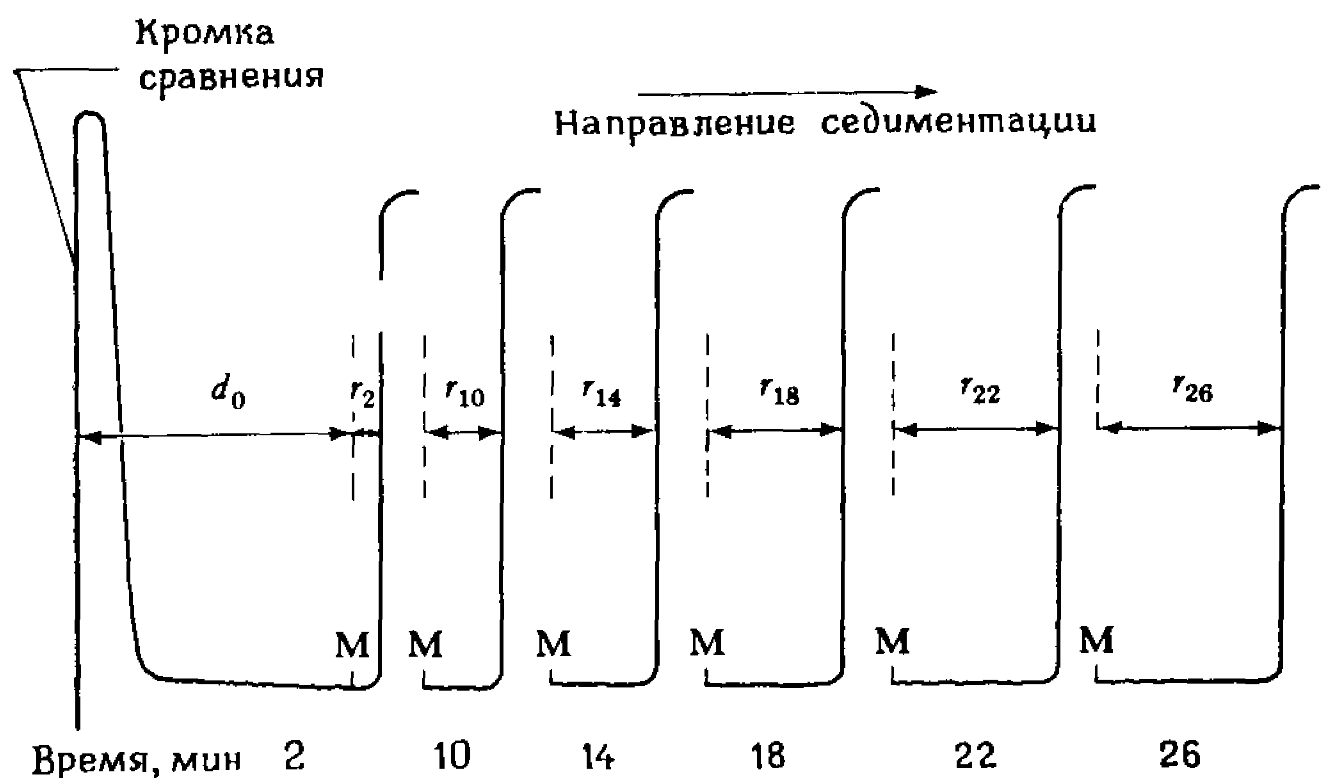


РИС. **11-50.**

Результаты фотометрирования фотографий седиментирующей ДНК фага Т7 *E. coli*, полученных с помощью системы измерения ультрафиолетового поглощения через шесть различных периодов центрифугирования (время центрифугирования увеличивается слева направо).

М — мениск, d_0 — расстояние от кромки сравнения до мениска. Обратите внимание, что с течением времени увеличивается расстояние между мениском и границей. Расчет значения r из d_0 и r_x приведен в тексте

Последующее обсуждение показывает способ определения наклона графика.

Результаты определения скоростной седиментации с помощью фотометрической регистрации приведены на рис. 11-50. Заметим, левая диаграмма показывает индексную метку (в роторе центрифуги), находящуюся на расстоянии 5,7 см от оси вращения, и мениск; на каждой последующей диаграмме также показан мениск. Комбинированное увеличение фотографической и фотометрической систем известно, что дает возможность определять расстояние, как функцию времени. Это осуществляется путем измерения расстояния r_x от мениска до границы (см. рисунок) и последующего прибавления расстояния d_0 от индексной границы до мениска. Деление этой суммы на коэффициент увеличения оптических систем и прибавление к полученному результату 5,7 см дает следующие значения:

Время после достижения 33 000 об/мин	Расстояние от оси вращения, см	ln r
2	6,225	1,8284
10	6,310	1,8421
14	6,358	1,8493
18	6,400	1,8561
22	6,445	1,8632
26	6,491	1,8705

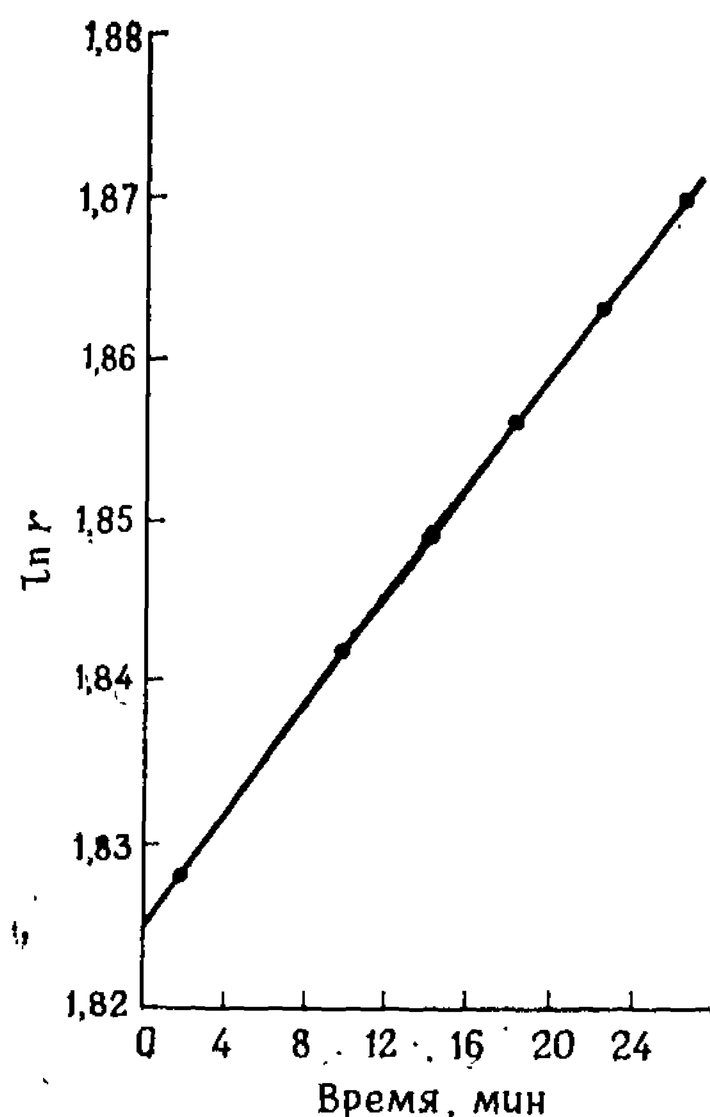


РИС. 11-51.

График зависимости данных (см. текст), полученных при фотометрировании (рис. 11-50).

По этим цифрам строится график, как показано на рис. 11-51. В результате получается прямая линия, наклон которой равен $0{,}0521/(24\cdot 60)$ $с^{-1} = 3{,}62\cdot 10^{-5}$. Скорость центрифуги равна 33 000 об/мин $= (33\,000\cdot 2\pi)/60 = 3{,}45\cdot 10^3$ рад/с. Следовательно, ω^2 составляет $1{,}19\cdot 10^7$.

$$s = 30{,}1 \cdot 10^{-13}\ с.$$

Так как единица Сведберга равна 10^{-13} с, $s = 30{,}1$ единицы Сведберга. С помощью уравнения (5) это значение можно превратить в $s_{20,\,в}$.

Список литературы

Baldwin R. L., Boundary Spreading in Sedimentation-Velocity Experiments. 5. Measurement of the Diffusion Coefficient of Bovine Albumin by Fujita's Equation, Biochem. J., 65, 503—512 (1957). Детали измерения *s*.

Brewer J. M., Pesce A. J., Ashworth R. B., Experimental Techniques in Biochemistry, Ch. 6, Prentice-Hall, 1974.

Freifelder D., Molecular Weights of Coliphages and Coliphages DNA. 4. Molecular Weights of DNA from Bacteriophages T4, T5 and T7 and the General Problem of Determination of *M*, J. Mol. Biol., 54, 567—577 (1970).

Freifelder O., Zonal Centrifugation, in "Enzymology", vol. 27, edited by C. H. W. Hirs and S. N. Timasheff, Academic Press, 1973, pp. 140—150.

Hearst J. E., Schmidt C. W., Density Gradient Sedimentation Equilibrium, in "Methods in Enzymology", vol. 27, edited by C. H. W. Hirs and S. N. Timasheff, Academic Press, 1973, pp. 111—127.

Meselson M., Stahl F. M., The Replication of DNA in *Escherichia coli*, Proc. Nat. Acad. Sci., 44, 671—682 (1958).

Meselson M., Stahl F. M., Vinograd J., Equilibrium Sedimentation of Macromolecules in Density Gradients, Proc. Nat. Acad. Sci., 43, 581—588 (1957). Развитие метода равновесного центрифугирования в CsCl.

Radloff R., Bauer W., Vinograd J., A Dye-Buoyant-Density Method for the Detection and Isolation of Closed Circular Duplex DNA: The Closed Circular DNA in HeLa Cells, Proc. Nat. Acad. Sci., **57**, 1514—1521 (1967). Метод с использованием бромида этидия.

Schachman H. K., Ultracentrifugation in Biochemistry, Academic Press, 1959.

Schumaker V., Zimm B. H., Anomalies in Sedimentation. 3. A Model for the Inherent Instability of Solution of Very Large Particles in High Centrifugal Fields, Biopolymers, **12**, 877—894 (1973). Агрегация, зависящая от скорости.

Svedberg T., Pedersen K. O., The Ultracentrifuge, Oxford University Press, 1940.

Szybalsky W., Kubinski H., Hradeĉna Z., Summers W. C., Analytical and Preparative Separation of Complementary DNA Strands, in "Methods in Enzymology", vol. 21, edited by L. Grossman and K. Moldave, Academic Press, 1971, pp. 383—413.

Szybalski W., Use of Cs_2SO_4 for Equilibrium Density Gradient Centrifugation, in "Methods in Enzymology", vol. 12B, edited by L. Crossman and K. Moldave, Academic Press. 1967, pp. 330—360.

Van Holde K. E., Baldwin R. L., Rapid Attainment of Sedimentation Equilibrium, J. Phys. Chem., **62**, 734—743 (1958). Метод низкоскоростного равновесия.

Vinograd J., Bruner R., Kent R., Weigle J., Band-centrifugation of Macromolecules and Viruses in Self-generating Density Gradients, Proc. Nat. Acad. Sci., **49**, 902—910 (1963). Развитие метода зонального центрифугирования.

Yphantis D., Equilibrium Ultracentrifugation of Dilute Solutions, Biochemistry, **3**, 297—317 (1964). Метод высокоскоростного равновесия.

Zimm B., Anomalies in Sedimentation. 4. Decrease in Sedimentation Coefficients of Chains at High Fields, Biophys. Chem., **1**, 279—291 (1974). Теория зависимости седиментации от скорости.

Полезная информация содержится также в руководстве к ультрацентрифуге фирмы Beckman, Model E.

Задачи

11-1. Если два стержня, жесткий и гибкий, имеют одинаковые молекулярные массы, длины и толщины, какой из них будет иметь большее значение *s*? Что можно сказать о сплошной и полой сферах с одинаковыми радиусами и массами?

11-2. При седиментации двух веществ с различными *s* в одной ячейке их границы с течением времени будут непрерывно разделяться. Напишите уравнение, описывающее это разделение в зависимости от времени.

11-3. Предположим, что диссоциирующий и вновь ассоциирующий димер наносят на градиент сахарозы и седиментируют. Опишите распределение концентрации в ячейке через различное время после начала центрифугирования. Покажите приблизительно, как будет выглядеть распределение при исключительно быстрой и медленной диссоциации, а также при средней скорости диссоциации?

11-4. Предполагается, что реагент образует межцепочечные поперечные связи между двумя полинуклеотидными цепями ДНК. Как можно это доказать методом седиментации?

11-5. Очень компактную молекулу белка обрабатывали реагентом, который привел к понижению *s* приблизительно на 40%. При этом получалась одна граница. Что можно сказать о действии реагента, если после обработки граница становится а) ýже или б) шире?

11-6. Плотность большинства белков в CsCl составляет 1,3, хотя от этого значения могут быть отклонения в пределах 0,050 г/см^3. Можно ли разделить два белка с молекулярными массами 10 000 и плотностями 1,300 и 1,340 равновесным центрифугированием в CsCl? (Скорость центрифугирования для седиментации в CsCl находится в пределах от 20 000 до 50 000 об/мин. Хотя градиент плотности зависит от скорости, для приближенного расчета его можно считать равным 0,020 г·см$^{-3}$·мм$^{-1}$.)

11-7. Опишите распределение концентрации в ячейке центрифуги, содержащей смесь из четырех компонентов с $s = 18$, 26, 45 и 52, количества которых составляют 15, 25, 50 и 10% от общего количества соответственно.

11-8. Белок с молекулярной массой 50 000, дающий одну резкую седиментационную границу, седиментирует в 6 *М* хлориде гуанидиния. При этом наблюдается два шлиреновских пика, соответствующих молекулярным массам, приблизительно равным 5000 и 15 000. Площадь более медленного пика составляет две трети от площади более быстрого. Что можно сказать о субъединичной структуре белка?

11-9. ^{14}N- и ^{15}N-ДНК *E. coli* (50% G·C) разделяют в градиенте плотности CsCl на 1,32 мм при определенной скорости и температуре. Какова будет дистанция между ^{14}N-ДНК *E. coli* и ДНК, содержащими 30 и 70% G·C при центрифугировании в этой же ячейке?

11-10. Образец ДНК дает одну зону в CsCl, но две зоны в CsCl в присутствии бромида этидия. Отношение площадей более плотной зоны к менее плотной равно 2 : 1. Молекулярная масса ДНК составляет 30·10^6. Предположим, что ДНК обработали ферментом, который даст в среднем один одноцепочечный разрыв в каждой молекуле. Каким будет соотношение площадей после такой обработки? (Напомним, что определение доли молекул, в которых не произошло разрывов, проводится исходя из распределения Пуассона.)

11-11. Скорость седиментации сверхспирализованной ДНК изучали в зависимости от концентрации добавляемого бромида этидия. При этом было найдено, что *s* вначале понижается, достигает минимума, после чего вновь увеличивается. Объясните причины этого явления.

11-12. Для определения коэффициента седиментации липопротеин суспендировали в 1 *М* NaCl и центрифугировали. При рассмотрении шлиреновских изображений было обнаружено, что пик появляется у дна ячейки и движется по направлению к ее верху. Объясните, что происходит.

11-13. Седиментацию раствора ДНК изучали с использованием ультрафиолетовой оптической системы. Раствор ДНК разделяли на три части. К части А ничего не добавляли, а к частям Б и В прибавляли два различных реагента. Затем каждую часть центрифугировали. Для части А наблюдались типичные границы. В частях Б и В границ не было видно ни в момент достижения нужной скорости, ни спустя несколько часов. В части Б ячейка была полностью прозрачна для ультрафиолетовых лучей как выше, так и ниже мениска. В части В ячейка была практически непрозрачной. Что можно предположительно сказать о действии прибавленных реагентов на ДНК?

11-14. Если ДНК пометить ^{3}Н-тимидином с удельной активностью 25 Ки/ммоль, каким будет сдвиг плотности в CsCl? Что будет в случае введения ^{14}С с 1 мКи/ммоль и ^{32}Р с 1 мКи/мкмоль?

11-15. Седиментация чистого белка в 0,25 *М* NaCl и NaI показала, что значения $s_{20,в}$ для этих систем различаются на 10%. Чем это можно объяснить? Каким образом предложенные возможности можно было бы различить с помощью равновесной седиментации?

11-16. Почему для получения значения *s* белка требуется больше, чем ДНК? (Вспомните способы регистрации границ.) Для каких типов белка это не так?

11-17. Вы проводите эксперимент по скоростной седиментации. Когда шлиреновский пик прошел половину пути, вы вспомнили, что забыли прибавить какой-то компонент к раствору. Вы остановили центрифугу, прибавили

необходимое вещество, взболтали содержимое и вновь разогнали центрифугу. При этом вы замечаете, что площадь шлиреновского пика стала меньше, чем при первом центрифугировании. Является ли это результатом добавления вещества? Будет ли полученное вами значение s в точности соответствовать получающемуся в ячейке?

11-18. Двухцепочечную ДНК можно превратить в одноцепочечную либо нагреванием в присутствии формальдегида, либо путем доведения pH до 12,5. Обычно седиментационные диаграммы ДНК, денатурированной любым из этих методов, идентичны. Однако, если ДНК смешать с акридиновым оранжевым, а затем смесь облучить небольшой дозой света, поглощаемого акридиновым оранжевым, денатурирование этими двумя методами приведет к различным результатам. В случае нагревания с формальдегидом седиментация как облученной, так и необлученной ДНК приводит к одному и тому же — одной резкой зоне с $s_{20,в}$ приблизительно на 30% большим, чем у нативной ДНК. Щелочная же обработка приводит к получению маленькой четкой границы и большого количества более медленно седиментирующего вещества. Объясните, чем вызваны эти различия.

11-19. Как можно экспериментально определить, будет ли определенный градиент плотности обеспечивать изокинетическую седиментацию? Будет ли градиент, изокинетический для ДНК, также изокинетическим для белка?

11-20. Можно ли ожидать, что кольцевая молекула ДНК покажет при седиментации скоростную зависимость? Объясните.

11-21. Как будет влиять прибавление бромида этидия на $s_{20,в}$ линейной ДНК?

11-22. При суспендировании белков в буферах, содержащих меркаптоэтанол, происходит разрыв дисульфидных связей. Можно ли обнаружить это с помощью седиментации? Рассмотрите нативный и денатурированный белок.

11-23. Плотность ДНК в 7 *M* $CsCl$, содержащем 0,1 *M* $MgCl_2$, меньше, чем в одном 7 *M* $CsCl$. Объясните почему.

ГЛАВА 12

Парциальный удельный объем и коэффициент диффузии

В гл. 11 отмечалось, что при использовании гидродинамических методов для характеристики макромолекул часто бывает необходимо знать парциальный удельный объем и коэффициент диффузии. Методы измерения этих параметров приводятся в данной главе.

Измерение парциального удельного объема

В теории ультрацентрифугирования часто встречается величина $1-\rho\bar{v}$, где ρ — плотность раствора, а $\bar{v}$ — парциальный удельный объем. Увеличение объема, вызываемое прибавлением к раствору единицы массы растворяемого вещества, равно $\partial v/\partial m=\bar{v}$. (Парциальный удельный объем иногда принимают равным обратной величине плотности растворяемого вещества, что не абсолютно точно, но часто дает хорошее совпадение.) Практика показывает, что увеличение объема раствора не соответствует объему твердого вещества; например, растворение стакана сахара в стакане воды дает раствор, объем которого значительно меньше двух стаканов (немного больше одного). Важно также помнить, что для данной макромолекулы $\bar{v}$ не является инвариантным параметром, а зависит от состава растворителя, т. е. от концентрации соли, pH, наличия или отсутствия других растворенных веществ и т. д.

Оценка значения $\bar{v}$ важна при определении молекулярной массы и коэффициента седиментации. Более того, требуется высокая точность измерения $\bar{v}$, так как диапазон значений $\bar{v}$ для биологических макромолекул (0,6—0,75) приводит к тому, что ошибка в 1% при измерении $\bar{v}$ дает ошибку около 3% в значениях M или $s_{20,\text{в}}$. В действительности измерение $\bar{v}$ часто бывает лимитирующим фактором при определении молекулярной массы. Существует три основных метода определения $\bar{v}$: суммирование $\bar{v}$ мономерных остатков макромолекулы, использование методов измерения плотности и параллельные измерения седиментационного равновесия в изотопно меченных растворителях.

Суммирование $\bar{v}$ мономерных остатков макромолекулы

Если точно известен аминокислотный состав белка, то $\bar{v}$ можно рассчитать из значений $\bar{v}$ индивидуальных аминокислот как $n_i m_i \bar{v}_i / \Sigma n_i m_i$, где n_i — число остатков на 1 моль i-й аминокислоты в белке, m_i — молекулярная масса остатка (молекулярная масса аминокислоты минус масса 1 моля воды, поскольку при образовании пептидной связи отщепляется 1 моль воды) и $\bar{v}_i$ — парциальный удельный объем i-го остатка. Значения $\bar{v}$ остатков приводятся в справочных таблицах. Если присутствуют другие группы, такие, как липиды, углеводы, флавины и т. д., необходимо приплюсовать $\bar{v}$ такой группы. Этот метод применим для белков, однако не проверен для нуклеиновых кислот.

Методы, основанные на определении плотности

Так как $\bar{v} = \partial v / \partial m$, значение $\bar{v}$ можно получить из изменений плотности раствора при изменении концентрации растворенного вещества. Сначала опишем четыре метода точного измерения плотности, а затем обсудим неожиданно сложную проблему точного измерения концентрации.

Пикнометрия

Пикнометр представляет собой сосуд с точно измеренным объемом, который может быть заполнен с большой точностью (рис. 12-1). Объем пикнометра обычно измеряют путем заполнения его водой и взвешивания, поскольку плотность воды хорошо известна. Затем его заполняют *раствором* и снова взвешивают.

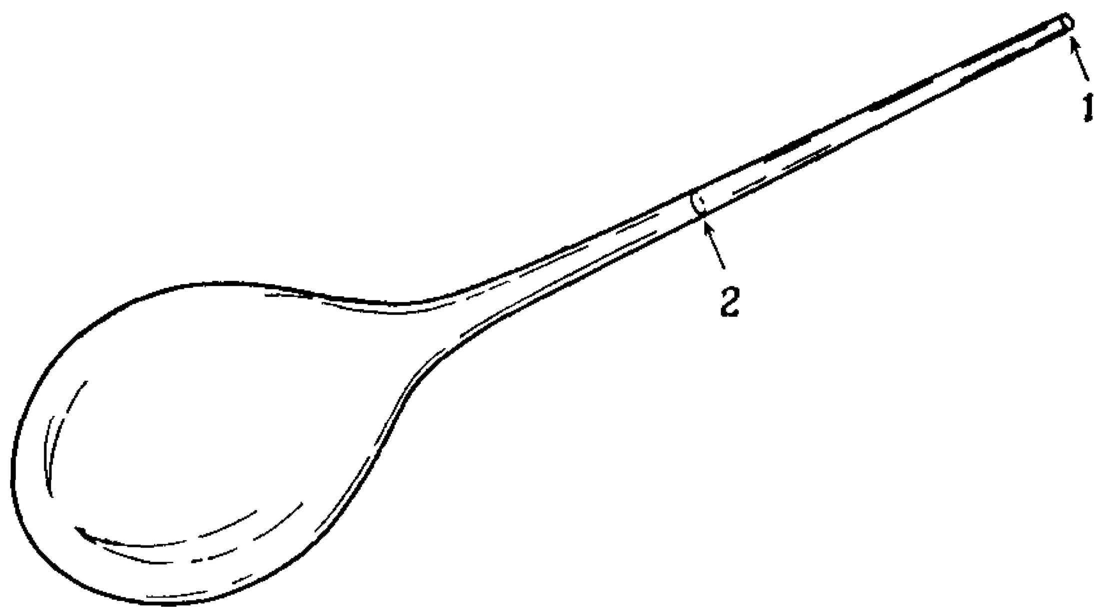


РИС. **12.1.**

Пикнометр.

Вначале взвешивают пустой пикнометр, затем его заполняют до метки и снова взвешивают. Объем до метки точно известен. *1* — отверстие для заполнения; *2* — метка.

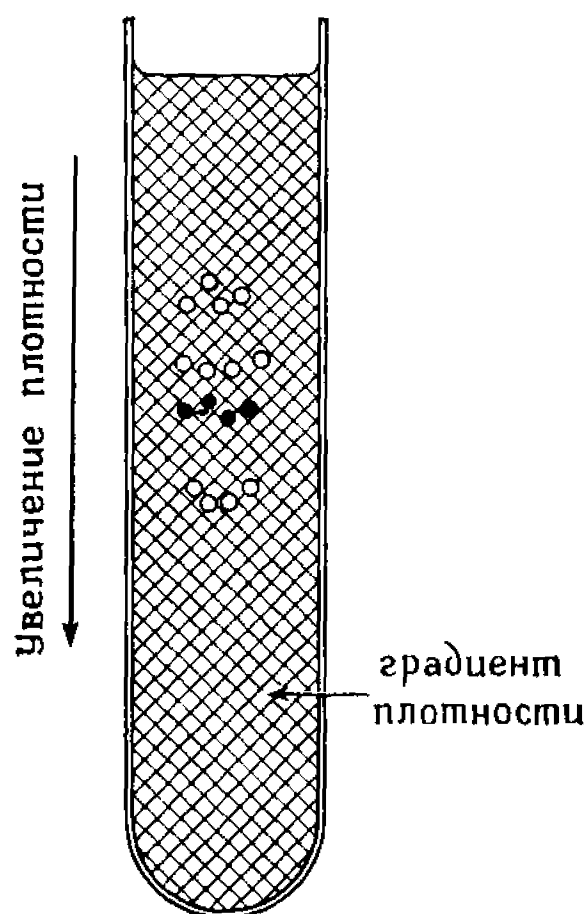


РИС. 12-2.

Колонка Линдерстрема—Ланга с градиентом плотности.

Линейный градиент плотности двух органических жидкостей (обычно бромбензола и керосина, которые смешиваются друг с другом, но не смешиваются с водой) получают, используя устройство, изображенное на рис. 8-5. На колонку для калибровки градиента плотности наносят капли растворов с известной плотностью (○). Положение капель образца (●) измеряют относительно капель сравнения.

Вследствие зависимости объема от температуры необходимо точно знать и контролировать температуру воды и раствора. Пикнометрия — самый прямой способ измерения $\bar{v}$, однако для достижения достаточной точности требуются большие объемы раствора с высокой концентрацией (50 мг/мл); часто бывает очень трудно получить такое количество вещества. Пикнометрию обычно не применяют для очень длинных молекул, таких, как ДНК с высокой молекулярной массой, поскольку уже при концентрации 10 мг/мл раствор превращается в довольно прочный гель, что не позволяет заполнить пикнометр.

Колонка Линдерстрема — Ланга с градиентом плотности

Для этого метода сначала готовят колонку с градиентом плотности смеси бромбензол — керосин, которые не смешиваются с водой (рис. 12-2). Если на поверхность жидкости в такой колонке нанести маленькую каплю (обычно 1 мкл) водного раствора, то она будет опускаться через колонку до тех пор, пока не достигнет точки, где ее плотность будет равна плотности жидкости в колонке. Если колонку предварительно прокалибровать растворами с известными концентрациями (обычно KCl), плотность образца можно определить по его положению относительно стандартов. Для определения градиента плотности и для точного определения положения образца в колонке необходимо большее число капель стандартов и образца. Во избежание термической конвекции, которая может сказаться на движении капель, температура градиента должна контролироваться с точностью до ±0,01°С. Большим преимуществом этого метода является возможность анали-

зировать очень малые количества материала, а также его надежность, хотя здесь и присутствуют некоторые источники ошибок, обусловленные взаимодействием с растворителями в градиенте.

Электрические весы Кана

Как и пикнометр, этот прибор позволяет точно взвешивать раствор известного объема и работать с маленькими объемами (1 мл) с относительно низкой концентрацией (~10 мг/мл). Эта возможность обусловлена высокой точностью таких весов (±0,1 мкг), что приблизительно в 1000 раз превышает чувствительность обычных лабораторных весов. Однако высокая стоимость прибора препятствует широкому распространению.

Метод механического осциллятора

Эта методика использует коммерческий механический осциллятор, который можно заполнить жидкостью (рис. 12-3), причем его резонансная частота зависит от плотности жидкости. Такой прибор дает высокую точность при объемах образцов меньше 1 мл, поэтому он находит широкое применение.

Любой метод, основанный на измерении плотности, требует знания точного значения концентрации. На первый взгляд эта задача выглядит тривиальной, и кажется, что для этого достаточно взвесить образец и растворить его. Однако нельзя забывать, что здесь требуется *масса безводного вещества,* а белки и нуклеиновые кислоты, к несчастью, всегда содержат некоторое количество связанной воды. Из неорганических образцов воду можно удалить путем нагревания при высокой температуре, однако белки и нуклеиновые кислоты разлагаются при температуре

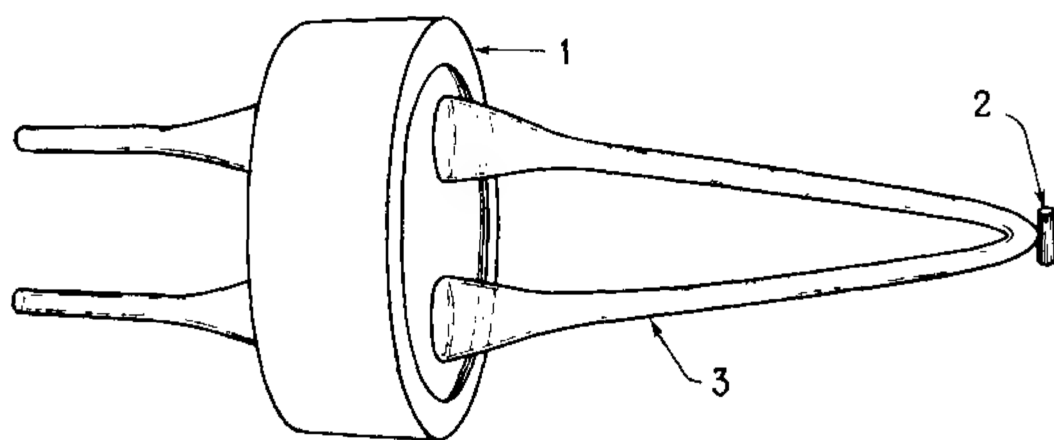


РИС. 12-3.

Механический осциллятор для измерения плотности.

Колеблющийся магнит в другом месте системы приводит в движение магнитный стержень, который в свою очередь передает вибрацию на V-образную трубку. Собственная частота колебаний определяется формой и массой трубки. Трубку заполняют образцом, плотность которого нужно измерить, при этом изменяется собственная частота. Измеренная частота позволяет рассчитать массу прибавленной жидкости. Отсюда определяется плотность, так как объем V-образной трубки точно известен. *1* — стальной фланец; *2* — магнитный стержень; *3* — впускная и выпускная стеклянные полые трубки.

выше 100°С. Поэтому применяют стандартную методику, состоящую в высушивании образца белка или нуклеиновой кислоты в вакууме при температуре от 60 до 80°С до постоянной массы; при этом предполагают, что постоянная масса указывает на полное удаление воды. Тем не менее полное удаление воды из белка требует такой высокой температуры, что происходит разложение. В качестве альтернативы, сухую массу можно определять по данным элементного состава, однако такой подход использовался всего лишь несколько раз. Например, так как известны химические формулы всех аминокислот и нуклеотидов, можно рассчитать массу аминокислот и нуклеотидов по содержанию фосфора и азота, которое определяется с точностью до 1%. Следовательно, если раствор, используемый для определения плотности, проанализировать на содержание фосфора и азота, то по аминокислотному или нуклеотидному составу можно рассчитать сухую массу белка или нуклеиновой кислоты (если состав неизвестен, то его, конечно, нужно определить).

Параллельное измерение седиментационного равновесия растворов в H_2O и D_2O

При достижении равновесия распределение вещества в ячейке центрифуги описывается уравнением

$$M_{H_2O}\left(1-\bar{v}\rho_{H_2O}\right)=\frac{2RT}{\omega^2}\left(\frac{d\ln c}{dr^2}\right)_{H_2O}, \qquad (1)$$

где M_{H_2O} — молекулярная масса в воде, R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, ω—угловая скорость (рад/с), c — концентрация, r — расстояние от оси вращения (см). Аналогичное уравнение можно написать и для раствора в D_2O. Говард Шахман с сотрудниками показали, что эти два уравнения могут дать значение $\bar{v}$, так как $\bar{v}$ практически одинаков в H_2O и D_2O *. Так как M_{H_2O} отличается от M_{D_2O} (в D_2O атомы водорода амидной группы обмениваются на дейтерий), одновременный анализ равновесной седиментации в H_2O и D_2O позволяет получить значение $\bar{v}$. Этот метод имеет большие преимущества, так как требует очень малого количества вещества и $\bar{v}$ измеряется одновременно с M. При ограниченном количестве вещества этот метод служит единственно подходящим, хотя и уступает в точности методам, основанным на измерении плотности. Тем не менее вследствие ошибок, вносимых при измерениях сухой массы,

---

* Согласно Шахману, во сколько раз M возрастает в D_2O, во столько же раз $\bar{v}$ уменьшается (*Edelstein S. J., Schachman H. K.*, in «Methods in Enzymology», eds. L. Grossman, K. Moldave, Vol. 27, 1973, pp. 83—98).— *Прим. ред.*

на практике метод, вероятно, дает бо́льшую точность по сравнению с другими. Можно достигнуть значительного увеличения точности, если использовать $D_2{}^{18}O$, которая в последнее время стала доступной.

Измерение коэффициента диффузии

В гл. 11 говорилось, что молекулярную массу (M) можно определить по результатам измерения коэффициента седиментации (s) и коэффициента трения (f). Прямое определение f представляет трудную задачу; к счастью, эти сложности можно обойти с помощью измерения коэффициента диффузии D.

Диффузия представляет собой перемещение молекул из области с высокой концентрацией в область с низкой концентрацией этих молекул при отсутствии движущей силы, т. е. в результате беспорядочного движения (рис. 12-4). Коэффициент диффузии молекулы может быть просто определен по закону Фика, который связывает число молекул dn, проходящих через площадь A за время dt, с градиентом концентрации dc/dt следующим уравнением:

$$\frac{dn}{dt} = -DA\left(\frac{dc}{dt}\right). \tag{2}$$

Исходя из того, что при большем коэффициенте трения молекулы движутся медленнее, можно показать, что

$$D = \frac{kT}{f}, \tag{3}$$

где k — константа Больцмана и T — абсолютная температура.

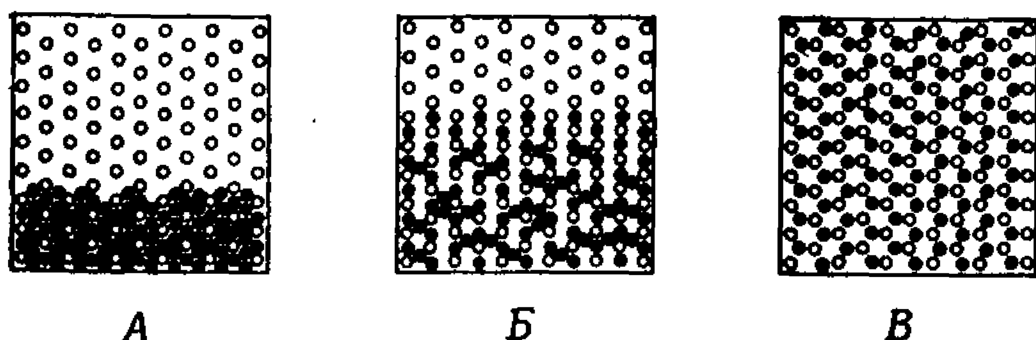


РИС. 12-4.

Механика диффузии.

Черные кружки первоначально находятся на дне сосуда. Затем они диффундируют вверх до тех пор, пока не распределятся равномерно по системе. A — $t=0$; $Б$ — через некоторое время; $В$ — равновесие.

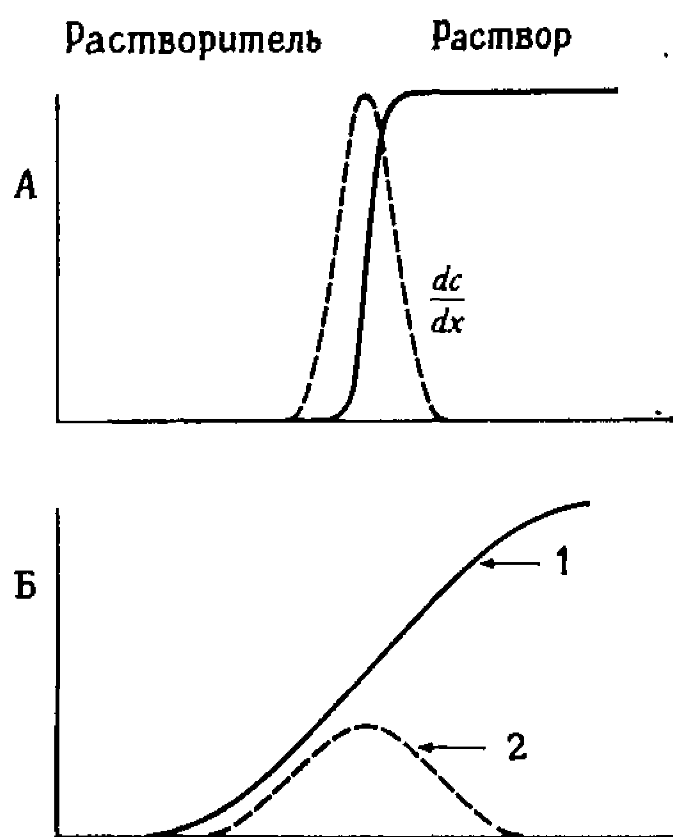


РИС. 12-5.

Измерение диффузии.

А — начальное распределение концентрации, когда растворитель и раствор вошли в соприкосновение; кривая зависимости *с* от *х* показывает концентрацию раствора вдоль ячейки, dc/dx от x — градиент концентрации или шлиреновское изображение. *Б* — через некоторое время. *1* — зависимость *с* от *х*; *2* — зависимость dc/dx от *х*.

Теперь уравнение Сведберга [гл. 11, уравнение (1)] можно записать в следующем виде:

$$M = \frac{RTs}{D(1-\bar{v}\rho)}, \qquad (4)$$

где R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, $\bar{v}$ — парциальный удельный объем макромолекулы и ρ — плотность раствора. Если известны s и D, из этого уравнения можно рассчитать значение M.

Коэффициент диффузии макромолекул обычно измеряют путем создания границы между буфером и раствором макромолекул с известной концентрацией с последующим наблюдением уширения этой границы во времени. Теоретически это измерение выглядит очень простым, однако на практике оно заключает в себе потенциальную ошибку. Например, D макромолекулы настолько мал (от 10^{-8} до 10^{-5}), что для получения измеряемого уширения требуется в нормальных условиях целый день. В течение всего этого времени система не должна испытывать никаких механических воздействий, а точный контроль температуры должен исключить термическую конвекцию. Кроме того, если молекула заряжена (например, имеет общий положительный заряд), наличие в растворе дополнительных ионов OH, которые диффундируют быстрее, чем макромолекула, приводит к образованию градиента электрического потенциала, который направляет макромолекулы, несущие заряд, в область с низкой концентрацией. Отсюда следует, что измерение коэффициента диффузии следует проводить в изоэлектрической точке или вблизи нее в растворе с достаточно высокой ионной силой, чтобы нейтрализовать или устранить влияние создаваемого электрического поля. Кроме того, поскольку теория основана на допущении, что молекулы

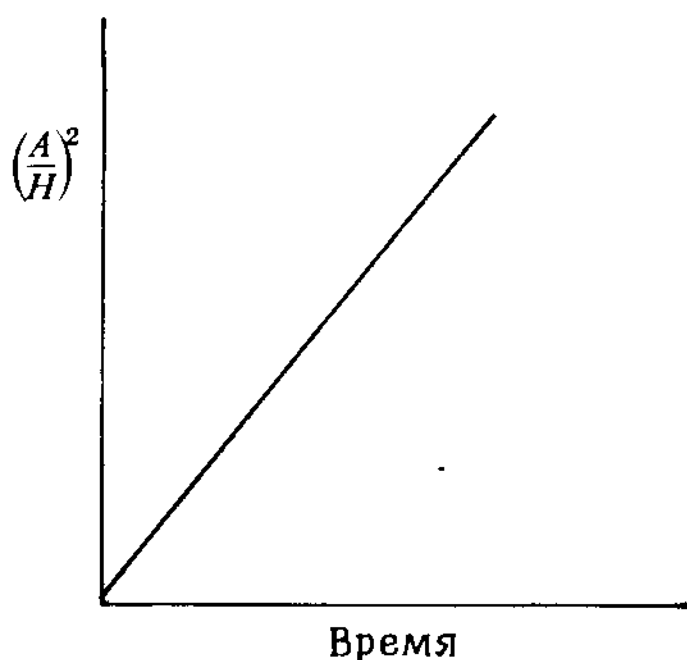


РИС. 12-6.

Типичный график для определения коэффициента диффузии.

A и H — площадь и высота кривой dc/dx на рис. 12-5. Для небольших молекул белка шкала времени включает несколько часов, для больших вирусов она может составлять несколько дней. Обратите внимание, что прямая не проходит через начало координат. Это связано с тем, что в начальный момент граница редко бывает идеальной. Наклон графика равен $4\pi D$.

должны двигаться независимо друг от друга (т. е. они не должны взаимодействовать), необходима экстраполяция до бесконечно большого разбавления.

В каждом методе, основанном на расширении границы, начальное распределение концентрации соответствует изображенному на рис. 12-5, *А*, и изменения во времени измеряются, как показано на рис. 12-5, *Б*. Измерение облегчается при наблюдении градиента концентрации с применением шлиреновской оптики (гл. 11). Если A и H — площадь и высота шлиреновской кривой, то

$$4\pi Dt = \left(\frac{A}{H}\right)^2, \qquad (5)$$

а график зависимости $(A/H)^2$ от t представляет собой прямую линию с наклоном $4\pi D$ (рис. 12-6).

Начальную границу можно получить несколькими путями. В стандартной диффузионной ячейке растворитель наслаивается на раствор макромолекул. Начальная граница может быть получена в специальной ячейке аналитической центрифуги для искусственного образования границы (рис. 12-7), в которой при достижении критической скорости растворитель проходит через тонкий капилляр в раствор. В этом случае центрифуга работает на скорости, достаточно низкой для того, чтобы седиментация не оказывала заметного влияния. Такой метод полезен в случаях, когда можно получить лишь образец небольшого размера. Вариант метода центрифугирования заключается в том, что ячейку заполняют только раствором и центрифугируют; граница образуется в результате седиментации, а уширение границы измеряют в процессе седиментации, однако для анализа данных используют другое уравнение.

Существует замечательный метод — смешанная оптическая спектроскопия, который включает рассеяние светового луча лазера. Поскольку молекулы в растворе совершают поступательное движение (т. е. диффундируют), в рассеянном свете будет наблю-

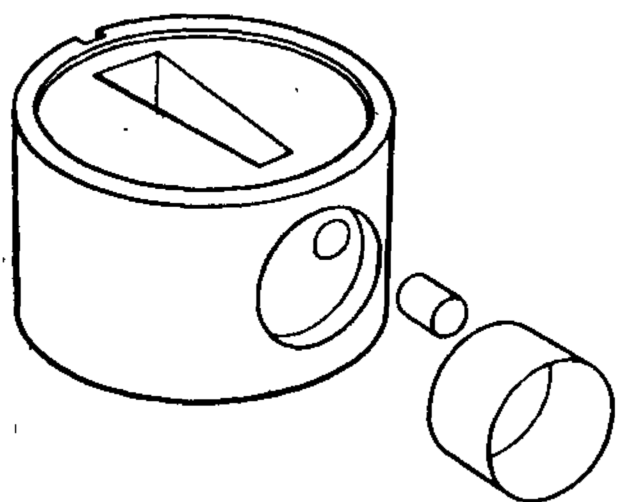


РИС. 12-7.

Один из типов границеобразующей ячейки * (клапанного типа) для ультрацентрифуги фирмы Beckman.

Алюминиевый сердечник с плоскодонным гнездом на том месте, где обычно находится отверстие для заполнения (рис. 11-3), имеет небольшое круглое отверстие с канавкой по периметру (на рисунке не показана) на дне гнезда. В это отверстие вставляется резиновая пробка. В гнездо помещается большой стакан, имеющий отверстие, в которое плотно входит пробка. Стакан содержит растворитель, а сектор сердечника — раствор. В неподвижности пробка не пропускает растворитель, однако при центрифугировании пробка сжимается и растворитель проникает из стакана через канавку в сектор (с любезного разрешения Beckman Instruments).

даться эффект Допплера, вследствие чего рассеянный свет будет обладать немного отличающейся частотой. Этот сдвиг частоты измеряют при смешении рассеянного и нерассеянного света с последующим измерением частоты получающихся биений (т. е. разности частот). Эта разность связана с D простой зависимостью. Такой метод обеспечивает точность измерений до 1%, позволяет использовать небольшие образцы (несколько сот микрограммов), измерения проводятся быстро, причем здесь нет зависимости от конвекции или электрических эффектов. Недостатки метода — отсутствие серийных приборов и непригодность его для определения D молекул с очень большой длиной цепи.

В настоящее время нет удовлетворительных методов для измерения D больших несферических молекул, таких, как ДНК, поскольку в этих случаях значение D очень мало.

Список литературы

Bancroft F. C., Freifelder D., Molecular Weights of Coliphages and Coliphage DNA. 1. Measurements of the Molecular Weigths of Phage Particles by High Speed Equilibrium Centrifugation, J. Mol. Biol., 54, 537—546 (1970). Пример измерения $\bar{v}$ методом пикнометрии и путем определения азота и фосфора.

Bauer N., Determination of Density, in "Phusical Methods of Organic Chemistry", vol. 1, edited by A. Weissberger, Wiley, 1949, pp. 253—296. Руководство по пикнометрии.

---

* Для измерения коэффициента диффузии в аналитической центрифуге чаще рекомендуется употреблять другую ячейку — границеобразующую двухсекторную капиллярного типа (см. *Chervenka C. H.*, Manual of Methods for Analytical Ultracentrofuge).— *Прим. ред.*

Dubin S. B., Benedeck G. B., Bancroft F. C., Freifelder D., Molecular Weights of Coliphages and Coliphage DNA. 2. Determination of Diffusion Coefficients Using Optical Mixing Spectroscopy and Measurement of Sedimentation Coefficients, J. Mol. Biol., **54**, 547—566 (1970).

Dubin S. B., Lunacek J. H., Benedeck G. B., Observation of the Spectrum of Light Scattered by Solutions of Biological Macromolecules, Proc. Nat. Acad. Sci., **57**, 1164—1171 (1967). В этой и предшествующей статьях описано использование оптической спектроскопии для определения *D*.

Edelstein S. J., Schachman H. K., Measurements of Partial Specific Volume by Sedimentation Equilibrium in H_2O—D_2O Solutions, in "Methods in Enzymology", vol. 27, edited by L. Grossman and K. Moldave, Academic Press, 1973, pp. 83—98.

Einstein A., Investigation on the Theory of Brownian Movement, Dover, 1956. Классическая теория диффузии.

Gosting L. J., Measuremnt and Interpretation of Diffusion Coefficients of Proteins, Advan. Protein Chem., **11**, 429—554 (1956). Хороший обзор по технике измерения диффузии.

Kratky O., Leopold H., Stabinger H., The Determination of the Partial Specific Volume of Proteins by the Mechanical Oscillator Technique, in "Methods in Enzymology", vol. 27, edited by L. Grossman and K. Moldave, Academic Press, 1973, pp. 98—110.

Kupke D. W., Density and Volume Change Measurements, in "Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry", part C, edited by S. J. Leach, Academic Press, 1973, pp. 1—75.

Задачи

12-1. Аминокислоты в LiCl и KCl имеют различные парциальные удельные объемы. Можно ли ожидать, что эта зависимость будет соблюдаться и для белков? Объясните и определите величину эффекта.

12-2. Будет ли различаться значение $\bar{v}$ РНК в NaCl и $MgCl_2$?

12-3. Для определения $\bar{v}$ растворенного вещества использовали пикнометр. Масса пустого пикнометра равна 14,2056 г, а заполненного водой при 20°C 24,1305 г. Раствор получен при растворении 3,5921 г вещества в 9,9413 г воды. Пикнометр, заполненный этим раствором при 20°C, весит 25,5307 г. Чему равен $\bar{v}$ растворенного вещества? (Плотность воды при 20°C составляет 0,9982 г/см^3.)

12-4. Если при определении *D* по измерениям *A* и *H* график зависимости $(A/H)^2$ от *t* представляет собой кривую, а не прямую, что можно сказать о причинах этого явления? Предположим, что кривая состоит из двух ветвей, каждая из которых асимптотически приближается к прямой. Какие заключения можно из этого сделать?

12-5. Макромолекула с $\bar{v}=0{,}74$ седиментирует в воде при 20°C; $s^0_{20,в}$ составляет 14,2, $D^0_{20}=5{,}82\cdot 10^{-6}$ см^2/с. Чему равна молекулярная масса?

12-6. В отсутствие конвекции ширина седиментационной границы, наблюдаемая в аналитической ультрацентрифуге, определяется практически только диффузией. Таким образом, скорость уширения границы можно использовать для определения *D*. Когда следует ожидать большей точности измерения *D*, при высокой или низкой скорости центрифугирования? Объясните. Будет ли всегда оправданным проведение таких измерений со смесью двух компонентов? Когда?

12-7. Будет ли *D* увеличиваться или уменьшаться с увеличением отношения осей? Чему будет соответствовать большее значение *D*, жесткому стержню или гибкому стержню, имеющим одинаковые длину и поперечное сечение и сделанным из одного материала? Как будут отличаться коэффициенты диффузии двух сфер с одинаковыми радиусами, но с различными плотностями?

ГЛАВА 13

Вязкость

Растворы, содержащие макромолекулы, имеют бо́льшую вязкость, чем чистый растворитель. Возрастание вязкости раствора по сравнению с вязкостью растворителя является функцией ряда параметров молекулы, каждый из которых увеличивает инкремент вязкости. Такими параметрами являются объем раствора, занимаемый молекулой, отношение длины молекулы к ее ширине (*осевое отношение* или отношение длин осей минимального эллипсоида вращения, в который может быть помещена данная молекула), а также жесткость молекулы. Для глобулярных молекул, какими являются молекулы многих белков, принципиальное значение имеет молекулярный объем, который легко может быть связан с молекулярной массой. В случае очень жестких тонких молекул, как, например, ДНК, основной эффект оказывает осевое отношение и оно также является функцией молекулярной массы. Следовательно, вискозиметрия может быть использована для определения M; с другой стороны, если величина M хотя бы приблизительно известна, то можно получить информацию об общей форме молекулы. Это два главных применения метода вискозиметрии.

Основы теории вязкости

Когда какое-нибудь вещество движется по поверхности, то этому движению препятствует трение. Если этим веществом является жидкость, то трение вызывает эффект, называемый вязкостью.

Рассмотрим жидкость, находящуюся между двумя большими параллельными пластинами (рис. 13-1, *А*), одна из которых неподвижна, а другая движется в направлении x со скоростью v. Движению бесконечно тонкого слоя жидкости, прилегающему к каждой пластине, препятствует трение. Следовательно, движущаяся пластина заставляет жидкость двигаться в направлении x со скоростью, приблизительно равной v, и слой, прилегающий к неподвижной пластине, движется очень медленно. Если представить, что жидкость состоит из большого числа слоев, то каждый слой будет скользить вдоль соседнего и сопротивление за счет трения между прилегающими слоями приведет к появлению градиента скорости (рис. 13-1, *А*). Вид деформации жидкости,

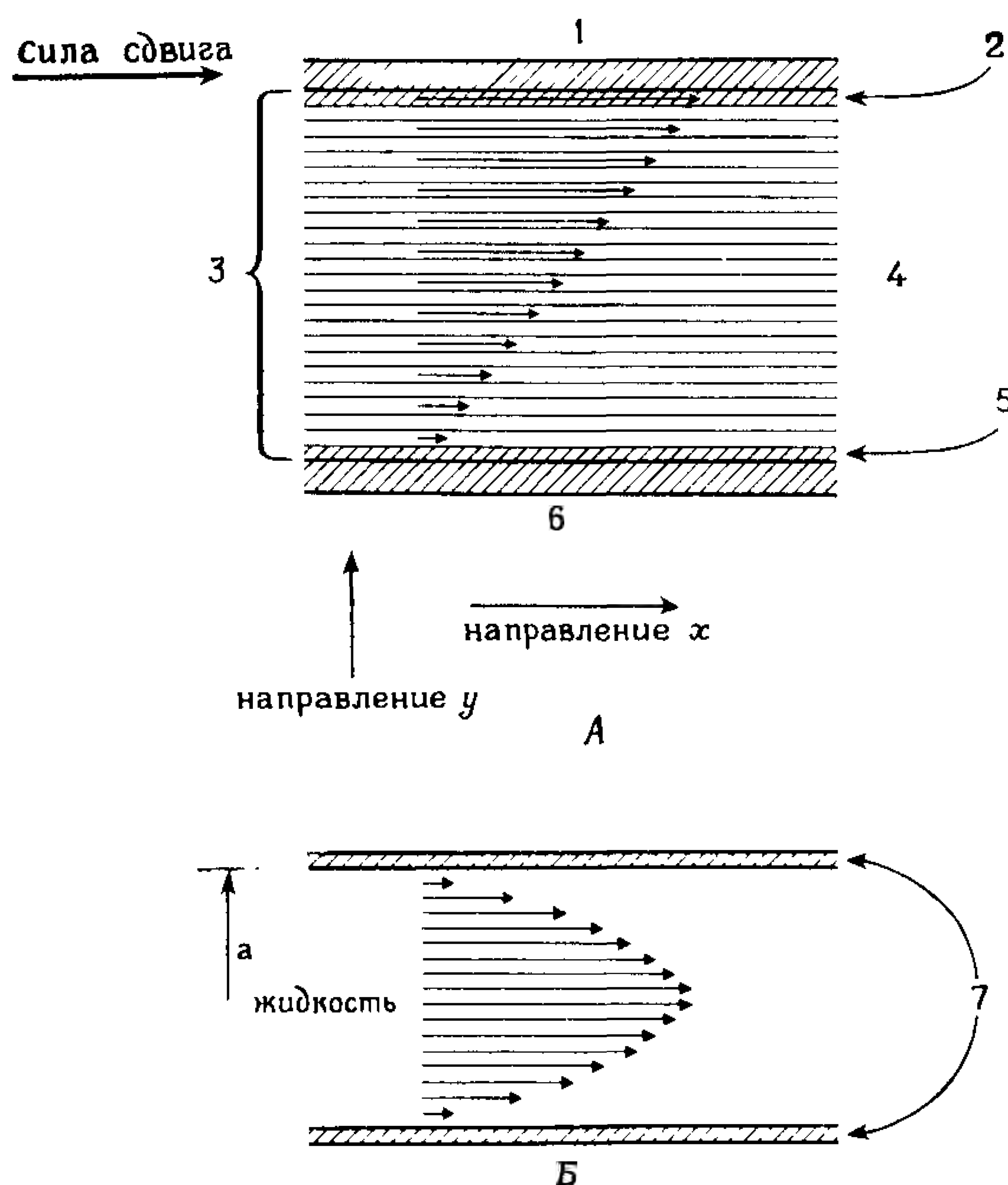


РИС. 13-1.

А — деформация сдвига жидкости между двумя параллельными пластинами, одна из которых неподвижна, а другая движется со скоростью v. Положения острия стрелок показывают градиент скорости. *Б* — профиль скорости движения жидкости по цилиндру с радиусом «а».

1 — пластина, движущаяся со скоростью v; *2* — слой жидкости, движущийся со скоростью, примерно равной v; *3* — жидкость, состоящая из бесконечно тонких слоев; *4* — длины стрелок отражают скорости движения слоя; *5* — почти неподвижный слой; *6* — неподвижная пластина; *7* — стенки трубки.

вызванный градиентом скорости, называется *сдвигом*. Ньютон показал, что сила сопротивления между слоями f пропорциональна площади слоев A и градиенту скорости между ними dv/dy:

$$f = \eta A \left(\frac{dv}{dy} \right). \tag{1}$$

Обычно η называют *коэффициентом вязкости* или просто *вязкостью*, $f/A = F$ — *напряжением сдвига*, $dv/dy = G$ — *градиентом сдвига* или *скоростью сдвига*. Если величина η постоянна, жидкость называется ньютоновой, если η — функция F или G, раствор называют неньютоновым.

Если жидкость находится не между пластинами, а течет по цилиндрической трубке, трение возникает у стенок трубки;

в этом случае скорость максимальна вдоль оси трубки и минимальна у ее стенок (рис. 13-1, *Б*), так что градиент скорости становится параболическим, а не линейным.

Во всех вискозиметрах, которые применяются в физической биохимии, используют либо параллельные пластины, либо трубки.

Условия течения, описанные в рис. 13-1, *А* и *Б*, соответствуют *ламинарному* течению; оно существует до тех пор, пока величина градиента сдвига не слишком велика; при очень высоких значениях градиента сдвига возникает *турбулентность*, при этом ситуация становится трудной для трактования как теоретически, так и экспериментально. Турбулентность здесь рассматриваться не будет.

Влияние макромолекул на вязкость раствора

Добавление макромолекул к растворителю * с вязкостью η_0 приводит к увеличению вязкости раствора до величины η. Это можно себе представить как результат увеличения трения между прилегающими мономолекулярными слоями жидкости (рис. 13-1), вызванного тем, что макромолекулы крупнее молекул растворителя и, следовательно, располагаются в нескольких таких гипотетических плоскостях. Изменение вязкости обычно выражают как отношение η/η_0, называемое относительной вязкостью $\eta_{отн}$. Эйнштейн показал, что $\eta_{отн}$ есть функция как размеров, так и формы макромолекул и отвечает следующему уравнению:

$$\eta/\eta_0 = 1 + a\phi + b\phi^2 + \cdots, \qquad (2)$$

где a — константа, зависящая от формы (для сфер $a = ^5/_2$), ϕ — доля объема раствора, занятая молекулами, и b — вторая константа, зависящая от формы. Это уравнение можно переписать в зависимости от концентрации c макромолекул с удельным объемом V одной молекулы, так что $\phi = Vc$, тогда

$$\eta/\eta_0 = 1 + aVc + bV^2c^2 + \cdots. \qquad (3)$$

Вязкость часто выражают как *удельную вязкость* $\eta_{уд}$, которая является долей изменения вязкости, вызванной только добавлением растворенного вещества, тогда

$$\eta_{уд} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \frac{\eta}{\eta_0} - 1 = \eta_{отн} - 1 = aVc + bV^2c^2 + \cdots. \qquad (4)$$

* Под *растворителем* в данном случае подразумевают чистый растворитель или разбавленный раствор малых молекул типа солей.

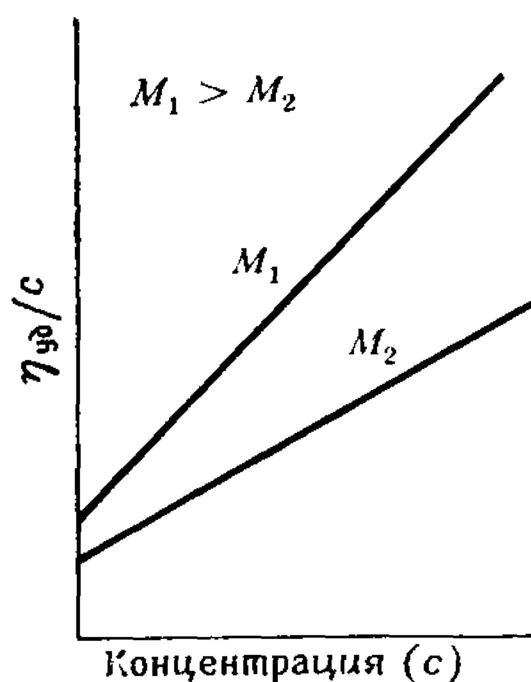


РИС. 13-2.

График зависимости отношения $\eta_{уд}/c$ от c для двух разных молекул ДНК.

Обычно эта зависимость линейна, причем наклон прямой уменьшается с уменьшением молекулярной массы (M). Хотя это не показано, для молекул со сферической симметрией прямая более пологая, чем для стержней.

Ни $\eta_{отн}$, ни $\eta_{уд}$ не могут быть связаны непосредственно с параметрами молекулы (например, с формой и объемом) вследствие межмолекулярных взаимодействий (т. е. соударений, запутываний). Для решения этой проблемы следует рассмотреть положение при очень низких (т. е. нулевых) концентрациях. Для этого введем понятие *внутренней, или характеристической, вязкости* $[\eta]$:

$$[\eta] = \lim_{c \to 0} \frac{\eta_{уд}}{c} = \lim_{c \to 0} aV + bV^2c^2 + \cdots \cong aV, \tag{5}$$

которая зависит только от константы a, связанной с формой, и от удельного объема V. Экспериментально это означает, что $[\eta]$ определяют путем измерения $\eta_{уд}$ при нескольких концентрациях, строят график зависимости $\eta_{уд}/c$ от c и экстраполируют к $c=0$. Пример данных, обычно получаемых при этом, показан на рис. 13-2.

Как было указано выше, $[\eta]$ все еще не всегда является полезным параметром, поскольку возможна неньютонова зависимость $[\eta]$ от G. Когда раствор макромолекул, имеющих большое осевое отношение (т. е. длинных и тонких, как ДНК), подвергают деформации сдвига, эти молекулы имеют тенденцию ориентироваться так, что их длинные оси параллельны направлению течения раствора. Такая ориентация понижает $\eta_{отн}$, потому что вклад макромолекул в сопротивление при скольжении слоев одного относительно другого уменьшается по мере того, как молекулы включаются в меньшее число слоев. Степень этой зависимости $\eta_{отн}$ от градиента сдвига увеличивается с увеличением осевого отношения, потому что длинная и тонкая молекула намного легче ориентируется, чем короткая и толстая. Это явление отражено на рис. 13-3, *Б*, на котором показана зависимость $[\eta]$ от G для молекул ДНК различной молекулярной массы; ясно, что, чем больше M (что в случае ДНК означает большее осевое отношение), тем меньше $[\eta]$ для данного значения G.

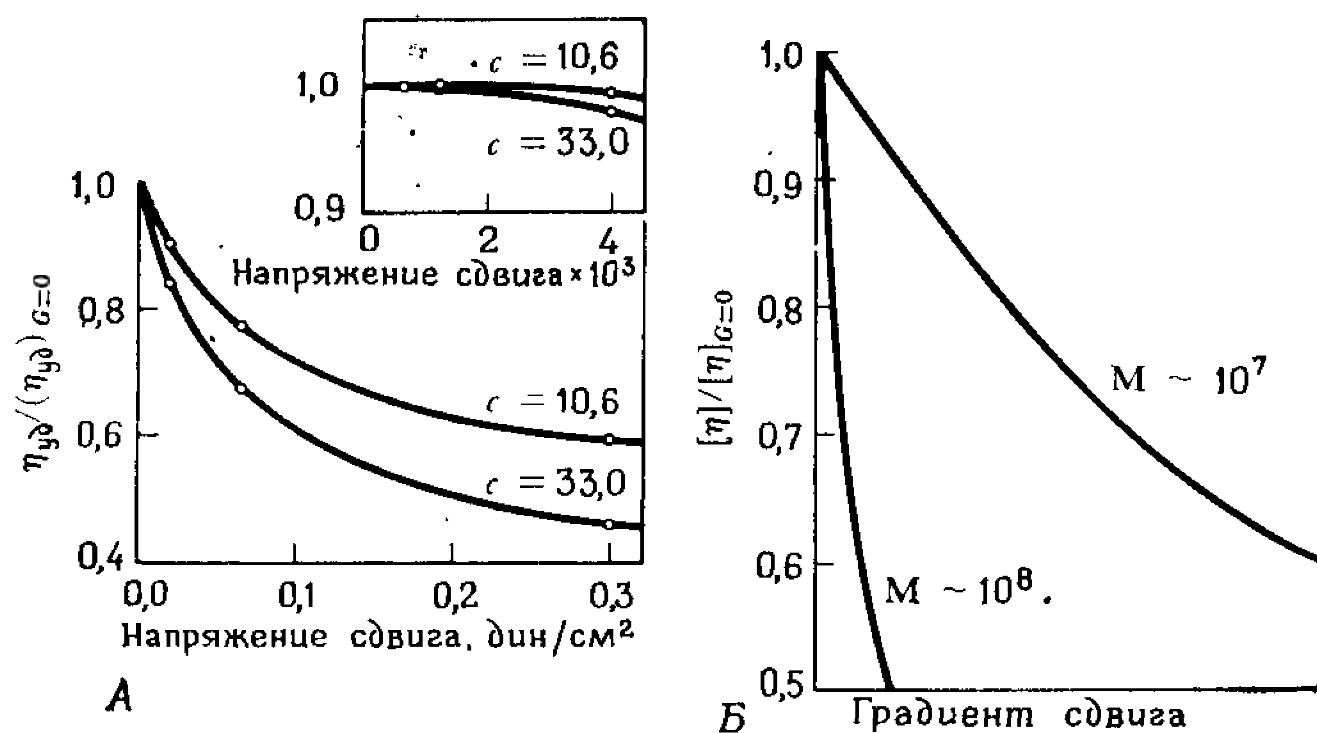


РИС. 13-3.

А — зависимость $\eta_{уд}$ ДНК фага Т2 ($M = 106 \cdot 10^6$) от напряжения сдвига, выраженная в процентах от величины $\eta_{уд}$ при нулевом сдвиге. Представлены кривые для двух различных концентраций (в миллиграммах на 1 мл). Отдельно изображено изменение формы при очень малых сдвигах. Наклон при нулевых значениях показывает, почему для исследований нативной ДНК очень важны вискозиметры, позволяющие работать при низких сдвигах, а именно потому, что экстраполяция к нулевому сдвигу из области больших значений может вызвать большие ошибки [*Crothers D. M., Zimm B. H.*, J. Mol. Biol. **12**, 525—536 (1965)]. *Б* — кривые, показывающие влияние молекулярной массы на зависимость $[\eta]$ от G. (Данные лишь приблизительны, они отобраны из ряда несвязанных экспериментов.)

Если форма зависит от градиента сдвига (например, если сдвиг деформирует молекулу), то $[\eta]$, которая зависит от формы [см. уравнение (5)], будет также уменьшаться с увеличением G. Поэтому для того, чтобы определить молекулярные параметры из значения $[\eta]$, необходимо измерить зависимость $[\eta]$ от G и экстраполировать к $G=0$. К сожалению, не существует специального обозначения для $[\eta]$ при $G=0$ (хотя обозначение $[\eta]_0$ представляется разумным), однако в научной литературе $[\eta]$ постоянно означает величину, приведенную к $G=0$, если имеется зависимость от G. На рис. 13-3, *А* показано, почему $[\eta]$ следует преимущественно измерять при низких сдвигах, а не просто экстраполировать из области высоких значений.

Эти рассуждения приводят к двум качественным эмпирическим правилам, которые можно применять, чтобы установить, большое или малое осевое отношение имеет данная молекула: 1) если $[\eta]_{отн}$ велика при низкой концентрации, макромолекула должна иметь высокое осевое отношение, и аналогично, если $\eta_{отн}$ мало при высоких концентрациях, молекула должна быть до некоторой степени компактной; 2) если $\eta_{отн}$ значительно уменьшается с увеличением градиента сдвига, осевое отношение должно быть высоким.

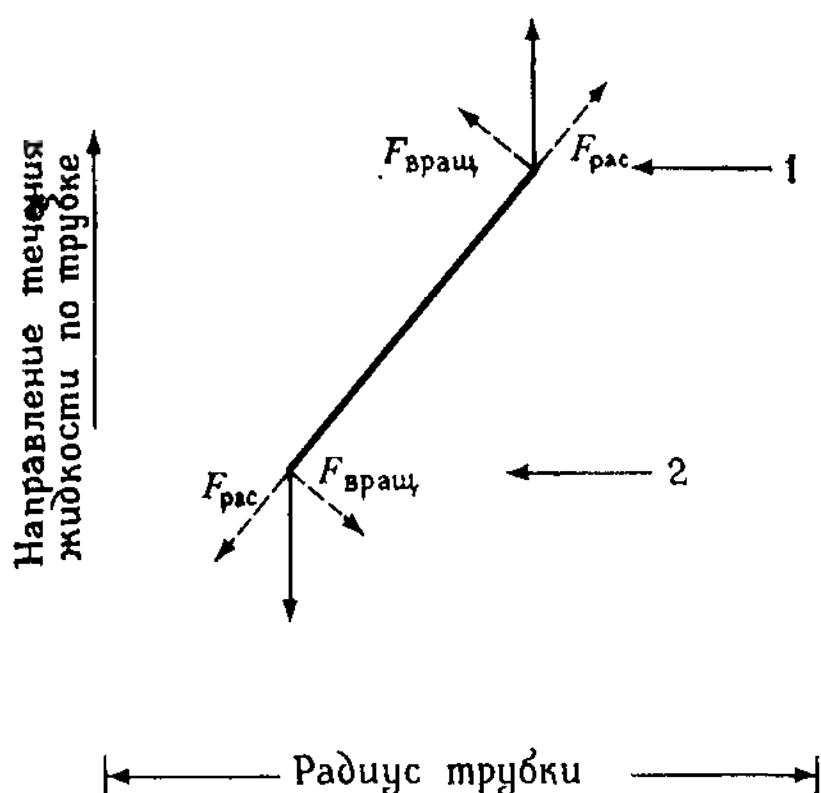


РИС. 13-4.

Стержнеобразная молекула в градиенте скорости, образующемся при протекании жидкости по трубке.

Линии потока жидкости вблизи центра трубки движутся быстрее, чем у стенок. Следовательно, на один конец молекулы действует движущая сила, а на другой — сила сопротивления. Они могут быть разложены на вращающую силу $F_{вращ}$ (вызывающую вращение молекулы) и растягивающую силу $F_{рас}$, которая может разорвать молекулу около ее середины. *1* — более быстро движущийся конец молекулы; *2* — менее быстро движущийся конец молекулы.

Два других действия деформации сдвига на $\eta_{отн}$ обозначают как *деградацию* и *реопексию*.

Термином «деградация» обозначают разрушение длинных и тонких молекул при высоком напряжении сдвига. На рис. 13-4 рассмотрено положение такой молекулы в градиенте скорости (показанном на рис. 13-1, *Б*). Заметьте, что вследствие непостоянства скорости протекания по трубке концы любой молекулы, расположенной под углом к линиям потока, будут двигаться с различными скоростями. Это будет приводить к вращению молекулы до тех пор, пока она не выравняется по линии потока, в этом случае на нее не будут действовать никакие силы. Следовательно, когда молекула находится под углом к линиям потока, на ее концы действуют различные силы. Эти силы могут быть разложены на перпендикулярные (вызывающие вращение) и параллельные (вызывающие растяжение) силы (рис. 13-4). Можно показать, что растягивающая сила максимальна: 1) в центре молекулы и 2) в том случае, когда молекула находится под углом 45° к линиям потока. Поскольку наибольшая сила действует в середине, наиболее вероятно, что молекула сломается пополам. Было проведено несколько интересных исследований этого явления разрыва пополам ДНК, некоторые результаты приведены на рис. 13-5.

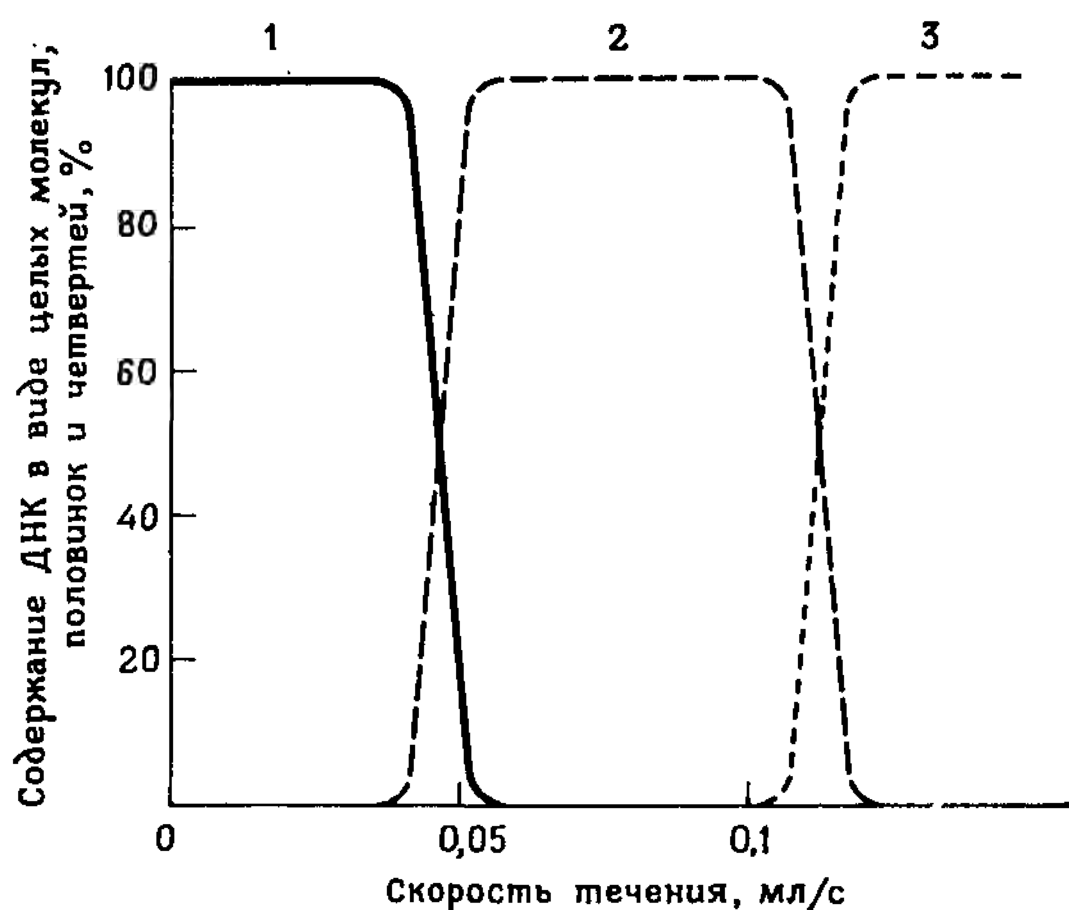


РИС. 13-5.

Разрыв ДНК фага T2 при прохождении через капилляр диаметром 0,25 мм при концентрации 0,1 мг/мл и различных скоростях течения.

Размер молекулы ДНК был определен зональным центрифугированием в градиенте концентрации $D_2O—H_2O$. При критической скорости течения молекула ДНК фага T2 разрывается пополам, но не на более мелкие части. При второй критической скорости каждая половинка разрывается еще раз пополам (на четверти). [Несколько идеализированные кривые получены при экстраполяции данных *Leventhal C., Davidson P. F.*, J. Mol. Biol., 3, 671—683 (1961).] *1* — целые молекулы; *2* — половинки; *3* — четверти.

Экспериментально деградация проявляется либо в резком уменьшении $\eta_{отн}$ при некотором значении *G* на кривой зависимости $\eta_{отн}$ от *G*, как показано на рис. 13-3, *Б*, либо в уменьшении величины $\eta_{отн}$ при повторных измерениях $\eta_{отн}$ при данном значении *G*. Деградация при сдвиге имеет большое значение для высокомолекулярной ДНК (гл. 18).

Реопексия обозначает такое явление, при котором величина $\eta_{отн}$ при относительно высоких напряжениях сдвига и концентрации увеличивается со временем. Это наблюдается только для веществ с очень высокой молекулярной массой, таких, как ДНК хромосом эукариотов, и это явление не совсем понятно. Поскольку $\eta_{отн}$ принимает нормальное значение после снятия сдвига, реопексию обычно наблюдают только тогда, когда $\eta_{отн}$ измеряется путем повторных определений в условиях продолжающегося сдвига, как в вискозиметре Зимма — Крозерса (см. следующий раздел).

Измерение вязкости

Для измерения вязкости было разработано много приборов. Ниже приведено описание тех из них, которые применяются для биополимеров. Вязкость варьирует в пределах 2% на 1°С при 20°С. Таким образом, необходим очень точный контроль температуры (±0,01°С), который осуществляется при помощи термостатированной водяной бани.

Капиллярный вискозиметр Оствальда

Этот вискозиметр состоит из капиллярной трубки с радиусом r и длиной L, через которую проходит объем V (рис. 13-6). Прибор используют следующим образом. Раствор наливают в отверстие 1 до тех пор, пока уровень жидкости не достигнет отметки Р. Затем производят подсасывание через отверстие 2 до тех пор, пока уровень жидкости не поднимется выше отметки А. Тогда подсасывание прекращают, и жидкость опускается вниз вследствие разницы в высоте двух рукавов (т. е. гидростатического давления). Время t, которое требуется для того, чтобы мениск прошел между отметками А и Б, измеряют. В результате измене-

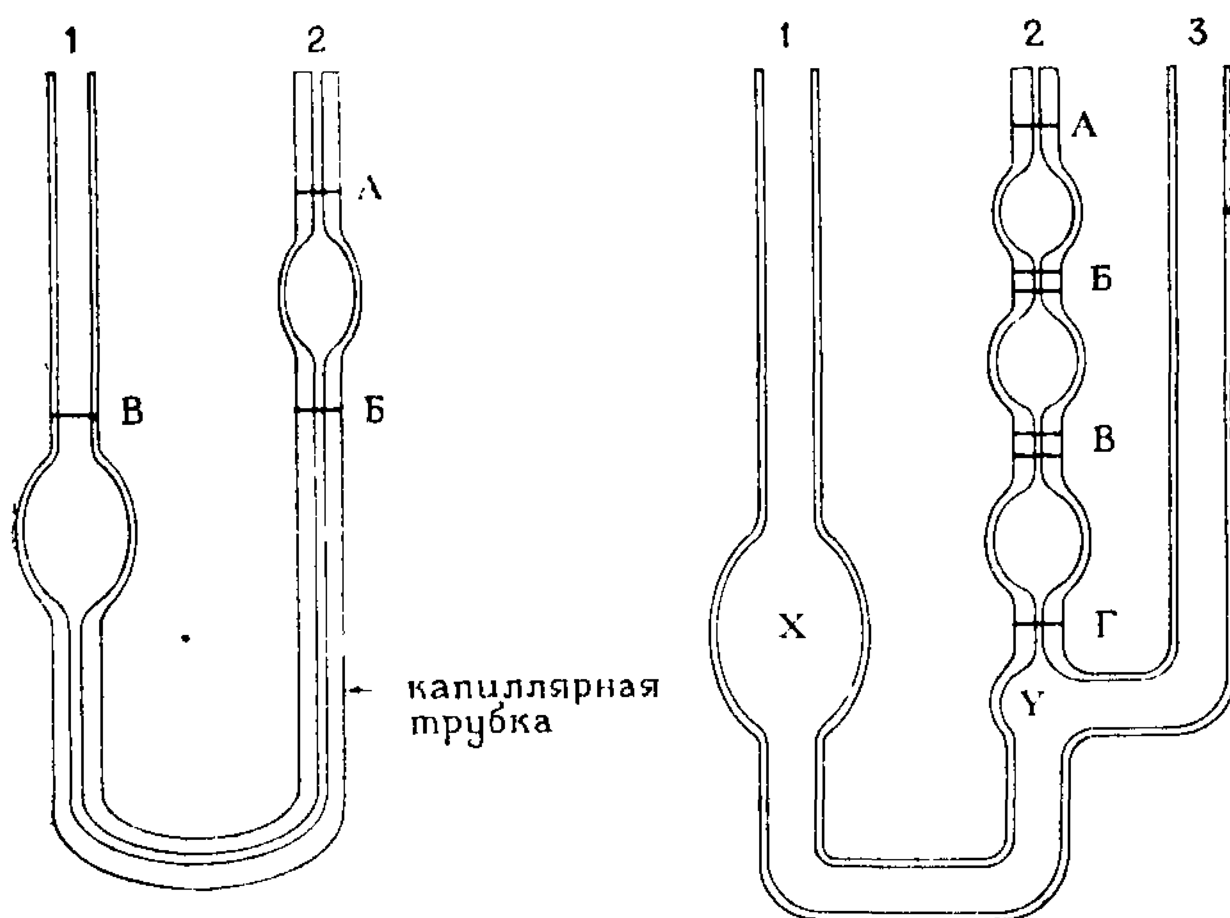


РИС. 13-6.

Капиллярные вискозиметры типа Оствальда (слева) и Уббелоде (справа). Описание деталей работы смотри в тексте.

В вискозиметре Уббелоде отметки Б и В состоят из двух черточек, причем верхняя предназначается для измерения отсчета времени движения мениска от А до Б, а нижняя — от Б до В. Такая двойная отметка позволяет остановить и снова пустить секундомер. Относительные величины градиентов сдвига обычно вычисляют из констант, приведенных в описаниях приборов.

ния относительной высоты жидкости скорость протекания не постоянна. Вязкость η и *среднее значение* G выражаются как

$$\eta = \frac{\pi h g \rho r^4 t}{8LV} \quad \text{и} \quad G = \frac{8V}{3\pi r^2 t}, \qquad (6)$$

где h — средняя высота жидкости, g — гравитационная константа и ρ — плотность. Точной оценки h, r и L можно избежать, измеряя

$$\eta_{\text{отн}} = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0} \frac{\rho}{\rho_0}. \qquad (7)$$

Преимуществом прибора является его низкая стоимость, однако он обладает теми недостатками, что нельзя изменять градиент сдвига и растворы не должны содержать пыли, чтобы не забивались тонкие капилляры.

Капиллярный вискозиметр Уббелоде

Как указывалось ранее, для того чтобы измерить $[\eta]$ при $G=0$, необходимо иметь возможность варьировать и концентрацию, и сдвиг. Вискозиметр Уббелоде сконструирован с учетом этого. Как показано на рис. 13-6, в вискозиметре имеется несколько шариков так, что при понижении давления в верхнем шарике средний градиент сдвига понижается. Прибор используют следующим образом. Жидкость наливают через отверстие 1 и заполняют сосуд X. Отверстие 3 при этом закрывают и производят подсасывание через отверстие 2 до тех пор, пока жидкость не установится над отметкой А. После этого открывают отверстие 3, а отверстие 2 закрывают, что приводит к освобождению сосуда Y. Открывают отверстие 2 и определяют время прохождения мениском отметки А, Б, В и Г. Это позволяет определить вязкость при трех различных значениях G. Для изменения концентрации раствор в сосуде X можно разбавить, потому что количество жидкости в этом сосуде не определяет объема жидкости, содержащегося между А и дном капилляра. Этот прибор очень легко ломается и забивается, но он может оказаться весьма полезным до тех пор, пока не требуется очень низких значений G*. Вискозиметр Уббелоде не находит больше широкого применения и заменен вискозиметром Зимма — Крозерса.

* Ограничение для G обусловлено тем, что G в первую очередь определяется длиной и диаметром капилляра. С увеличением диаметра скорость протекания возрастает до величины, которая окажется слишком большой для измерения, т. е. мениск будет двигаться слишком быстро. Для того чтобы это компенсировать, увеличивают длину капилляра. Для очень низких градиентов сдвига требуется невообразимо большая длина.

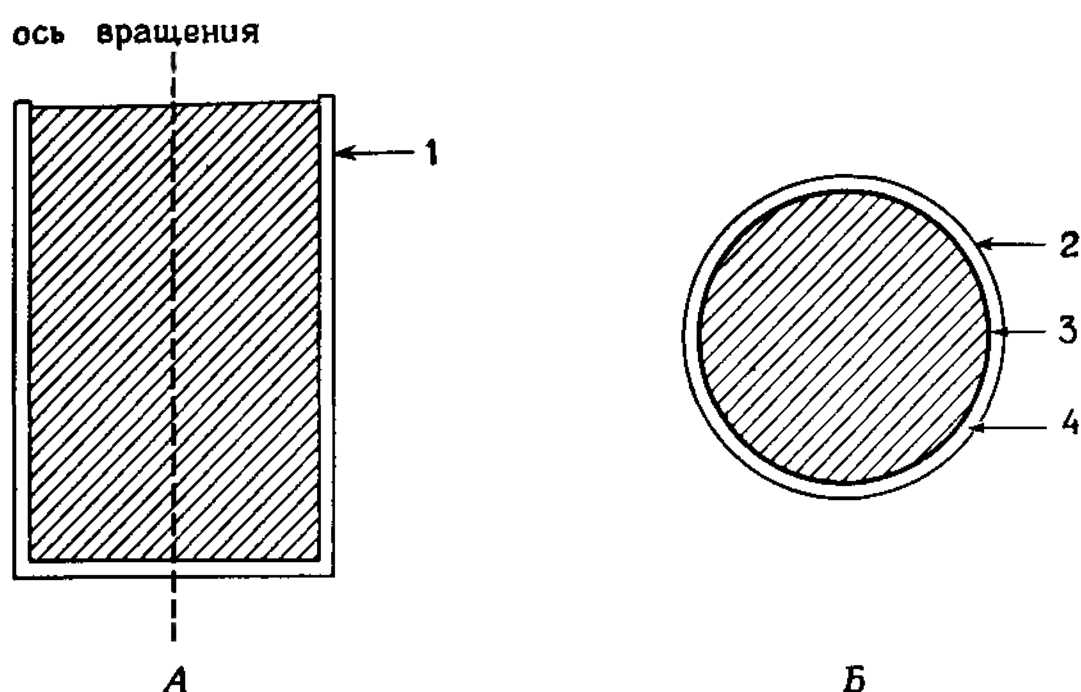


РИС. 13-7.

Вискозиметр Куэтта: внешний цилиндр обычно вращается, а внутренний неподвижен.

А — вид сбоку; *Б* — вид сверху. *1* — вращающийся внешний цилиндр; *2* — внешний цилиндр (ротор); *3* — внутренний цилиндр; *4* — кольцевой зазор, содержащий образец.

Вискозиметр Куэтта

Этот прибор предназначен для применения при относительно низких градиентах сдвига и состоит из двух концентрических цилиндров, разделенных узким кольцом, промежуток между которыми заполняется образцом (рис. 13-7). Один цилиндр закреплен неподвижно, а другой — вращается. Такая ситуация эквивалентна двум параллельным пластинам, показанным на рис. 13-1, *А*. Зная угловую скорость и размеры цилиндра, можно следующим образом вычислить величины, входящие в уравнение (1). Скорость слоя жидкости, прилегающего к неподвижному цилиндру, примерно равна нулю; для вращающегося цилиндра — это скорость вращения. В промежуточных слоях скорости пропорциональны радиальному расстоянию от неподвижного цилиндра. Следовательно, градиент сдвига является постоянной величиной и составляет

$$G = \frac{\pi RS}{30d}, \qquad (8)$$

где R — средний радиус цилиндров, S — скорость вращения (об/мин) и d — расстояние между цилиндрами. Напряжение сдвига F составляет $T/2\pi R^2h$, где h — высота цилиндра, а T — момент вращения, необходимый для того, чтобы поддерживать скорость вращения S. Таким образом, прибор действует при низких значениях G, которые можно контролировать и легко измерить, что очень ценно для неньютоновых жидкостей, когда бывает необходимо экстраполировать η к $G=0$. Сложность при-

бора Куэтта связана с силами на концах вискозиметра («концевые эффекты»). Заметьте, что верхняя поверхность жидкости подвергается действию капиллярных сил или поверхностному натяжению; внизу жидкость находится между неподвижной и вращающейся поверхностями. Практически вискозиметр Куэтта делают достаточно длинным, что приводит к пропорциональному уменьшению концевых эффектов.

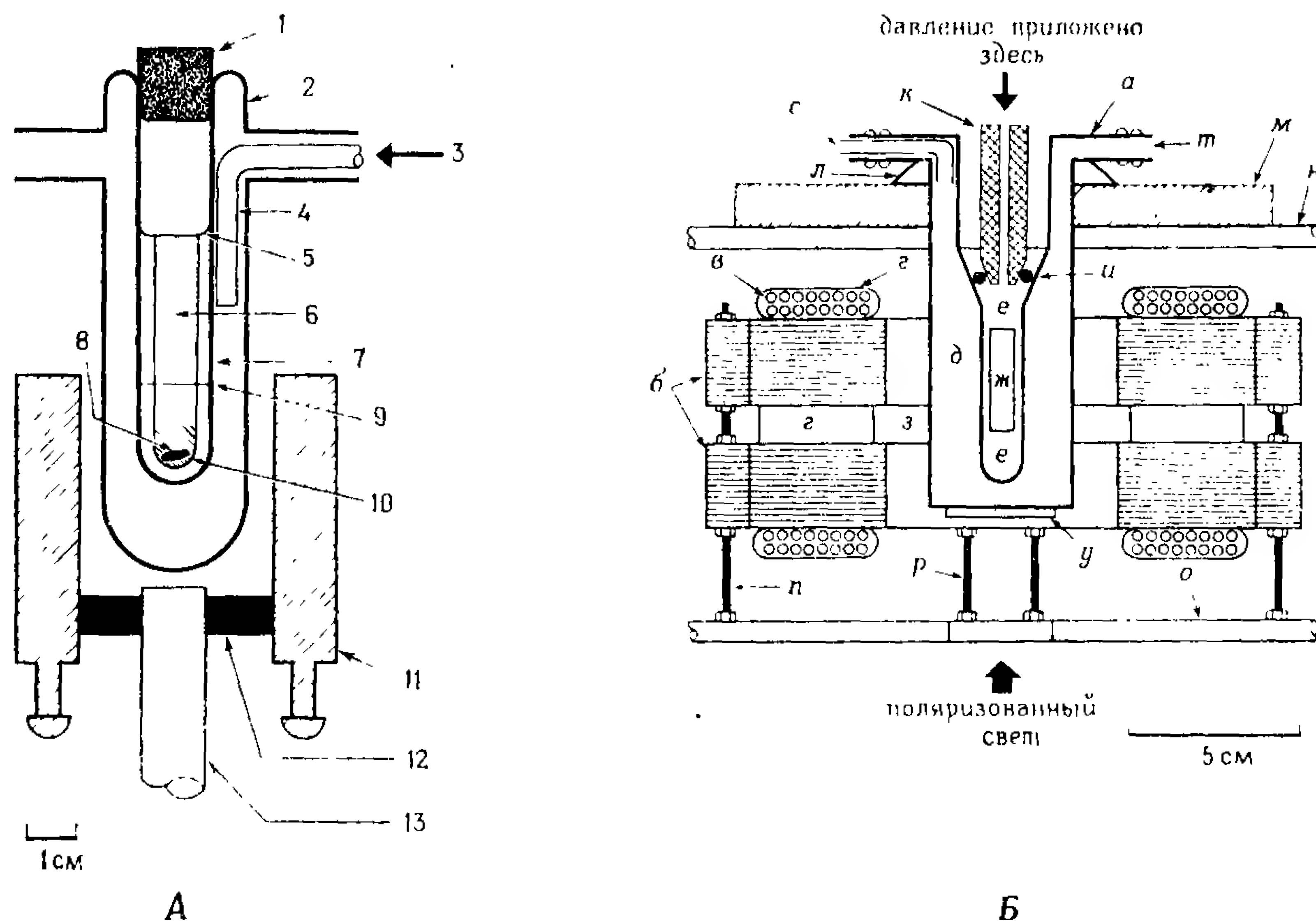


РИС. 13-8.

А — вискозиметр Зимма — Крозерса [*Zimm B. H., Crothers D. M.*, Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 905—911 (1962)]. *Б* — модификация с погруженным ротором.

1 — пробка; *2* — термостатирующий кожух; *3* — циркулирующая жидкость; *4* — впускная трубка; *5* — мениск; *6* — ротор; *7* — статор; *8* — стальная пластина; *9* — линия на роторе и статоре; *10* — пластмасса и Pb_3O_4; *11* — фрагмент железного полюса; *12* — магнит; *13* — привод мотора мешалки. *а* — стеклянная термостатированная камера образца (секция, выделенная жирной линией); *б* — пластины электромагнита (секция, выделенная горизонтальной штриховкой); *в* — обмотка электромагнита; *г* — слой изоляции вокруг обмотки; *д* — циркулирующая вода; *е* — раствор ДНК; *ж* — погруженный ротор (показаны только внешние очертания ротора); *з* — воздушный зазор в магните для наблюдения за ротором; *и* — резиновое кольцо, нужное для герметизации при повышенном давлении; *к* — стержень для создания давления; *л* — гипс; *м* — бакелитовый блок; *н* — верхняя алюминиевая подставка; *о* — средняя алюминиевая подставка; *п*, *р* — болты и гайки для крепления полюсов магнита к станине; *с*, *т* — показана циркуляция воды внутрь и наружу соответственно; *у* — матовая стеклянная пластина. Все части нарисованы в масштабе, приведенном внизу, кроме пластин магнита (*б*) и проводов обмотки электромагнита (*в*). [*Klotz L. C., Zimm B. H.*, Macromol., 5, 471—481 (1972).]

Ротационный вискозиметр Зимма — Крозерса с плавающим ротором и его модификация с погруженным ротором

Эта модификация вискозиметра Куэтта позволяет с высокой точностью работать при очень низких градиентах сдвига (рис. 13-8). Он принципиально отличается от вискозиметра Куэтта тем, что в приборе Куэтта градиент сдвига зафиксирован и измеряется напряжение сдвига, в то время как в данном вискозиметре напряжение сдвига задано, а измеряется градиент сдвига. Раствор помещают между неподвижным внешним цилиндром и плавающим в жидкости внутренним цилиндром, способным вращаться. Внутренний цилиндр содержит стальную пластинку. Снаружи внешнего цилиндра находятся вращающиеся магниты, которые заставляют эту пластинку, а поэтому и внутренний цилиндр вращаться. Скорость этого вращения зависит от количества стали во внутреннем цилиндре и вязкости жидкости и не зависит от скорости вращения магнита и плотности образца. Скорость сдвига можно варьировать изменением количества стали во внутреннем цилиндре (добавлением большего количества пластинок). Поскольку момент вращения пропорционален количеству металла во вращающемся магнитном поле, ротор будет вращаться намного быстрее и градиент сдвига возрастет. Градиент сдвига равен тангенциальной скорости, поделенной на радиальное расстояние между цилиндрами. Этот прибор просто измеряет вязкость относительно стандарта, такого, как вода, путем определения относительного количества времени, которое требуется, чтобы внутренний цилиндр проделал данное число вращений.

Проблемой для всех вискозиметров с вращающимися цилиндрами является действие поверхностных пленок у мениска (концевые эффекты, о которых говорилось в предыдущем разделе). Прибор с погруженным ротором позволяет решить эту проблему. В этой модификации прибора Зимма — Крозерса внутренний ротор содержит захваченный пузырек воздуха, который сжимается под действием прилагаемого давления на раствор сверху. В результате внутренний цилиндр превращается в поплавок, который может быть так отрегулирован, что он будет полностью погружен в жидкость. Этот прибор значительно больше подходит для точного измерения при низкой скорости сдвига. Модификация прибора с погруженным ротором, названного вязкоэластометром (используемым для другой цели), описана в последнем разделе.

Соотношение между характеристической вязкостью и молекулярной массой

Для полимеров, конфигурация которых представляет собой подобие статистического клубка, соотношение между [η] и M выражается формулой

$$[\eta] = KM^a, \tag{9}$$

где K и a — константы, зависящие от растворителя. Эти константы определяют обычно опытным путем для каждой системы растворитель — растворенное вещество, применяя соединения известной молекулярной массы, потому что все еще нет теории, пригодной для их расчета. Такого рода уравнения не выводятся для компактных молекул, таких, как вирусы, потому что [η] сложным образом зависит от отношения молекулярного объема к молекулярной массе. В общем случае для данной молекулярной массы значение [η] меньше для компактной формы, чем для статистического клубка с той же молекулярной массой. Действительно, вискозиметрия редко используется для характеристики очень компактных молекул, потому что другие методы, такие, как центрифугирование, представляют в этом случае бóльшую ценность.

Для белков, подвергнутых денатурации в 6 М растворе хлорида гуанидиния (вещество, которое разрывает все водородные связи так, что белок превращается в статистический клубок, если отсутствуют дисульфидные мостики внутри одной полипептидной цепи), a и K хорошо известны из большого числа опубликованных работ. Отношение обычно записывают в следующем виде:

$$[\eta] = 0{,}716\, n^{0{,}66}, \tag{10}$$

где n — число аминокислотных остатков в белке. Среднюю молекулярную массу на один остаток можно определить из аминокислотного состава, тогда как M можно вычислить из η. Это соотношение можно использовать также для того, чтобы определить другие свойства белков, как это будет показано в примерах 13-А и 13-Б.

Для двухцепочечных линейных молекул ДНК было найдено, что соотношение между [η] и M можно записать следующим образом:

$$0{,}665 \lg M = 2{,}863 + \lg([\eta] + 5). \tag{11}$$

Это истинно эмпирическое уравнение можно использовать для вычисления M при условии, что образец ДНК гомогенен по мо-

лекулярной массе. Это ограничение следует иметь в виду вследствие большой чувствительности ДНК к деградации при деформации сдвига, вызванной в процессе выделения и очистки (гл. 18).

Примеры использования вискозиметрии

Вискозиметрию можно количественно применять для определения молекулярной массы или полуколичественно для установления формы или для того, чтобы увидеть изменения молекулярной массы или формы. Молекулярную массу рассчитывают из графиков типа тех, что приведены на рис. 13-2 и 13-3, т. е. $\eta_{отн}$ измеряют при нескольких значениях c и G, а $[\eta]$ определяют для каждого значения G экстраполяцией отношения $\eta_{уд}/c$ к $c=0$ со второй экстраполяцией в дальнейшем к $G=0$. Это просто и не будет дальше объясняться. Следующие примеры показывают полуколичественное применение вискозиметрии. Основное правило, которым при этом руководствуются и которое было сформулировано выше,— увеличение или уменьшение вязкости характеризует соответственно увеличение или уменьшение осевого отношения. В примерах следует отметить, что этот вид информации может быть часто получен путем измерения одной только $\eta_{отн}$.

Пример 13-А. *Определение общей формы белков.* Как уже обсуждалось в гл. 1, белки можно условно разделить на очень компактные, статистические клубки, спиральные и полужесткие (или комбинацию трех последних). Представление об общей форме может быть получено из сравнения вязкости нативного и денатурированного белка. (Денатурацию можно вызвать действием кислоты, высокой температуры или денатурирующих агентов, таких, как хлорид гуанидиния). Поскольку денатурированная форма представляет собой статистический или околостатистический клубок (см. пример 13-Б для их различия), можно определить, является ли нативная форма более или менее компактной по сравнению со статистическим клубком по тому, увеличивается или уменьшается вязкость при денатурации. Например, $\eta_{отн}$ рибонуклеазы заметно увеличивается в процессе термической денатурации в кислоте; отсюда следует, что она имеет компактную нативную структуру (которая характерна для большинства глобулярных белков). С другой стороны, вязкость поли -γ-бензил-L-глутамата, имеющего форму жесткого стержня, в 4 раза уменьшается, если его поместить в условия, в которых он превращается в статистический клубок. Аналогично вязкость

белка коллагена и ДНК, очень жестких тройной и двойной спиралей соответственно, заметно уменьшается при денатурации. (Заметьте, однако, неявное предположение, что условия денатурации не приводят к какой-либо степени деполимеризации и что уменьшение вязкости обусловлено только изменением конфигурации. Это не всегда так; например, при низких pH, при которых имеет место денатурация ДНК, также происходят одноцепочечные разрывы, и, следовательно, этого следует избегать, если желательно произвести просто денатурацию.)

Пример 13-Б. *Обнаружение внутрицепочечных дисульфидных мостиков в белках.* Остатки цистеина в белках часто связываются дисульфидными мостиками. Эти дисульфидные мостики предохраняют белок от перехода к полностью неупорядоченной конфигурации клубка при денатурации, особенно в тех случаях, когда остатки цистеина разделены большим числом других аминокислот.

Такую молекулу можно определить как почти статистический клубок, потому что он более компактен, чем истинный статистический клубок. Дисульфидные мостики разрушаются при восстановлении 2-меркаптоэтанолом, а повторное замыкание получающихся сульфгидрильных (SH) групп можно предотвратить S-карбоксиметилированием иодацетамидом. Следовательно, если в нативной структуре имеются дисульфидные мостики, вязкость в 6 *M* хлориде гуанидиния будет больше после обработки меркаптоэтанолом, потому что молекула будет менее компактной. Например, тубулин из мозга теленка имеет $[\eta]=36{,}0$ мл/г до восстановления и 44,0 мл/г после восстановления, что свидетельствует о присутствии дисульфидных мостиков.

Из величин $[\eta]$ восстановленной и невосстановленной форм можно получить информацию о расстоянии между остатками цистеина, связанными S—S-связью. Было вычислено, что отношение $[\eta]$ для отдельного линейного полимера в конфигурации статистического клубка к величине $[\eta]$ для кольцевой структуры составляет 1,6. Следовательно, в примере тубулина, поскольку величина 44,0 соответствует прямой цепи (т. е. нет S—S-связей), то для кольцевой структуры (т. е. если S—S-мостик соединяет концевые аминокислоты) это значение должно быть $[\eta]=44{,}0/1{,}6=27{,}5$. Поскольку наблюдаемая величина составляет 36,0, ясно, что S—S-мостик связывает не концевые аминокислоты. Если эти связи соединяют близкие аминокислотные остатки, они будут оказывать малое влияние и значения $[\eta]$ окажутся очень близкими к 44,0 (и, возможно, неотличимыми). Следовательно, S—S-мостики не связывают близлежащие аминокислоты. Поскольку $[\eta]$ имеет величину, среднюю между 27,5 и 44,0, можно заключить, что, если имеется один или небольшое количество

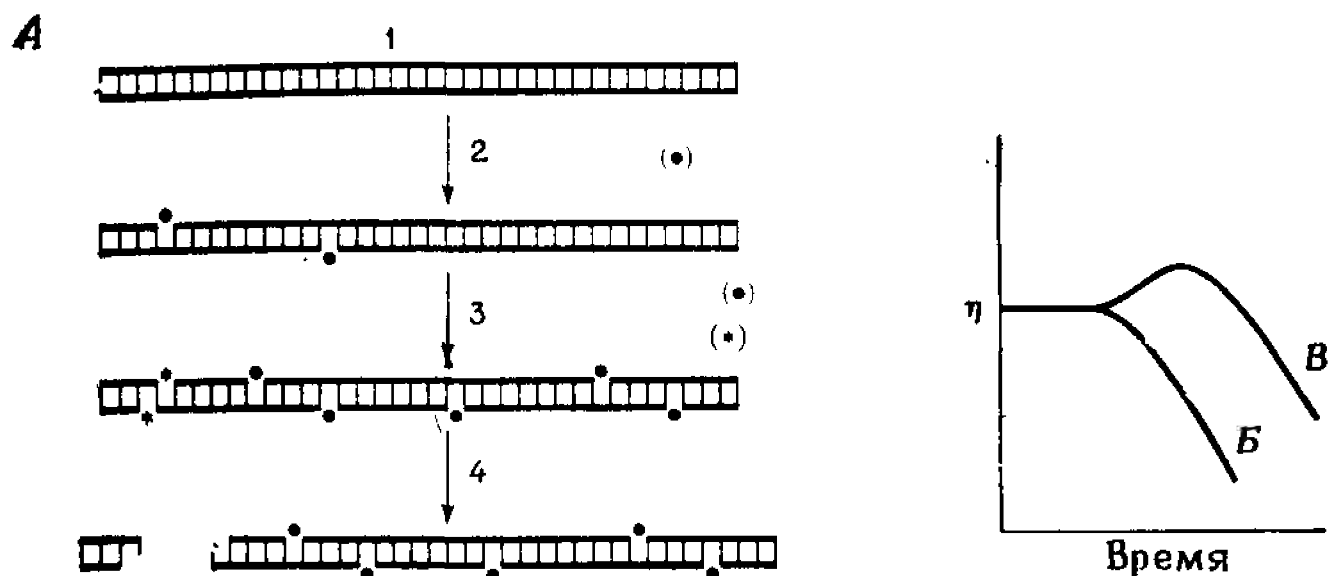


РИС. 13-9.

А — процесс совпадения одноцепочечных разрывов в ДНК, приводящий к образованию двухцепочечных. Точками указаны места разрывов. Звездочками показана пара разрывов, которые привели к двухцепочечному разрыву: они разделены только одной парой оснований, недостаточной для сохранения целостности молекулы. *Б* — зависимость вязкости ДНК фага Т2 от времени обработки панкреатической ДНКазой. ДНКаза приводит к одноцепочечным разрывам, которые в конце концов совпадают и при этом получаются двухцепочечные разрывы, что приводит к уменьшению вязкости. Кривая сначала горизонтальна, так как одноцепочечные разрывы не оказывают влияния на вязкость. (*В*) Ожидаемая форма кривой (как и кривой *Б*) для кольцевой ДНК. В момент, когда образуется двухцепочечный разрыв, молекула становится линейной и вязкость будет возрастать. Вязкость не уменьшается до тех пор, пока не образуется второй двухцепочечный разрыв.

1 — нет разрывов; *2* — появились разрывы; *3* — число разрывов увеличилось, пока два не совпали; *4* — фрагментация.

S—S-мостиков, то остатки цистеина должны располагаться достаточно далеко вдоль полипептидной цепи, но не слишком близко к ее концам.

Пример 13-В. *Соотношение кольцевой и линейной форм в молекулах ДНК.* В 1961 г. было показано, что генетическая карта фага Т2 *E. coli* циклична. Поскольку в то время не представлялось возможным наблюдать ДНК в электронный микроскоп для того, чтобы оценить кольцевую форму, исследовали изменение η_r единичного образца ДНК фага Т2, который непрерывно обрабатывался панкреатической ДНКазой. Этот фермент вызывает одноцепочечные разрывы фосфоэфирных связей, которые накапливаются и в конце концов совпадают таким образом, что образуются двухцепочечные разрывы (рис. 13-9,*А*). Эти одноцепочечные разрывы сами по себе не оказывают влияния на вязкость ДНК (рис. 13-9,*Б*) вследствие того, что жесткость молекулы поддерживается стэкинг-взаимодействием оснований (гл. 16). Следовательно, для линейной молекулы $\eta_{\text{отн}}$ постоянна в течение всего периода, когда образуются только одноцепочечные разрывы, и уменьшается благодаря уменьшению молекулярной

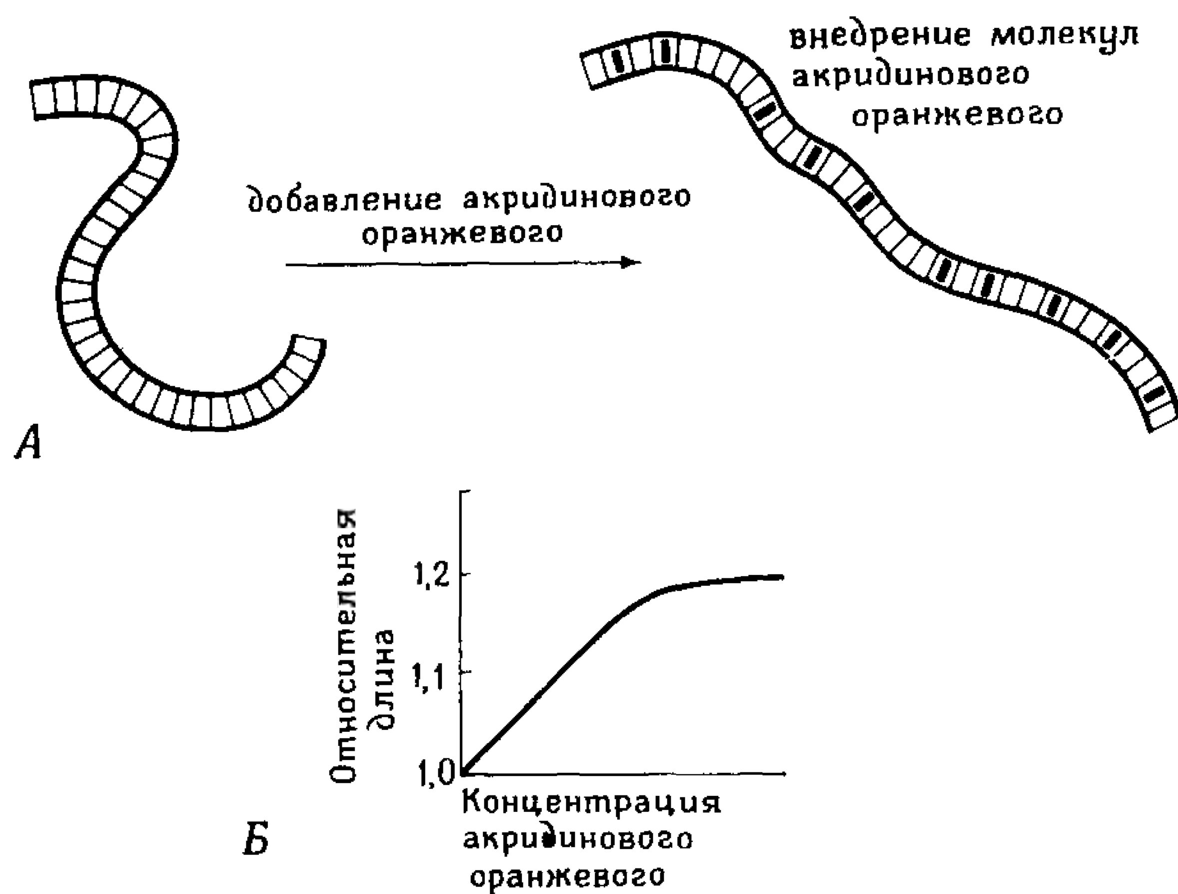


РИС. **13-10.**

А — проникновение молекул акридинового оранжевого между парами оснований ДНК. Молекула растягивается и становится более жесткой. *Б* — зависимость длины ДНК фага λ из *E. coli* от концентрации акридинового оранжевого, определенная методом электронной микроскопии (получено в лаборатории университета Брандейс).

массы, когда появляются совпадения в разрывах. Однако, когда в кольцевой молекуле ДНК происходит первый двухцепочечный разрыв, молекула становится линейной и η (рис. 13-9, *В*) увеличивается; поскольку возрастает осевое отношение, $\eta_{отн}$ до тех пор не уменьшается, пока не произойдет двух двухцепочечных разрывов. Для ДНК фага Т2 $\eta_{отн}$ постоянна при обработке ДНКазой в течение нескольких часов, а затем уменьшается; это показывает, что данная молекула линейна.

Пример 13-Г. *Доказательство методом вискозиметрии того, что некоторые вещества могут внедряться между гетероциклическими основаниями ДНК.* Краситель акридиновый оранжевый прочно связывается с двухцепочечной ДНК. Коэффициент седиментации (гл. 11) комплекса *уменьшается* по сравнению с коэффициентом седиментации свободной ДНК; это уменьшение может быть результатом либо деполимеризации, либо увеличения коэффициента трения, благодаря увеличению осевого отношения. Если уменьшение коэффициента седиментации обусловлено деполимеризацией, то $[\eta]$ должно понизиться, а если оно обусловлено увеличением коэффициента трения, то величина $[\eta]$ повысится. Экспериментально установлено, что величина $[\eta]$ комплекса больше, чем для свободной ДНК, так что осевое отношение комплекса должно быть больше, чем у свободной ДНК. Следова-

тельно, при связывании красителя должна увеличиваться длина ДНК. Исследования методом поляризации флуоресценции (гл. 15) показали, что краситель иммобилизован и располагается в той же плоскости, что и пары оснований. Таким образом, было сделано заключение, что краситель внедряется между основаниями в ДНК, увеличивая длину этой молекулы (рис. 13-10). Это заключение было подтверждено электронной микроскопией комплекса; ДНК становится длиннее и менее подвижной при связывании красителя.

Пример 13-Д. *Обнаружение образования ДНК при ферментативной полимеризации мононуклеотидов.* Если смесь ДНК и радиоактивных нуклеозидтрифосфатов инкубировать с ферментом ДНК-полимеразой I из *E. coli,* часть радиоактивного материала переходит в форму, осаждающуюся кислотой (гл. 5, пример 5-1). Это может быть результатом чистого синтеза, приводящего к *увеличению* количества ДНК высокой молекулярной массы, или *обмена* нуклеотидов в исходных молекулах. Если имеет место чистый синтез, $\eta_{отн}$ будет повышаться, поскольку увеличивается концентрация ДНК; если происходит только обмен, то количество ДНК не изменится и $\eta_{отн}$ будет постоянна. Во время, когда начиналась работа с полимеразой I, ДНК можно было отличить от нуклеотидов по световому рассеянию (при использовании образцов с высокой концентрацией ДНК, не содержащих белка), ультрацентрифугированию или ультрафиолетовому поглощению (при низких концентрациях и в отсутствие избытка материала, поглощающего в УФ-области) или методом вискозиметрии. Ферментативная реакция проходит при низкой концентрации ДНК и высокой концентрации белка и УФ-поглощающих нуклеотидов; таким образом, первые три возможности исключаются. При исследовании вязкости было показано, что η увеличивается при увеличении времени инкубации; это свидетельствует о том, что повысилось или количество ДНК, или ее молекулярная масса. Обе эти возможности подразумевают синтез ДНК.

Пример 13-Е. *Конформация комплексов ДНК с гистонами.* Гистоны — это белки, содержащиеся в хромосомах и связанные с ДНК. Для того чтобы понять роль гистонов в структуре хромосом и в регуляции экспрессии ДНК, исследовали структуру комплексов ДНК с гистонами.

При добавлении гистонов к ДНК коэффициент седиментации ДНК повышается. Повышение s означает либо увеличение молекулярной массы, либо уменьшение коэффициента трения (или осевого отношения). Характеристическая вязкость также увеличивается вследствие повышения либо молекулярной массы, либо осевого отношения. Качественно эти два результата могут подсказать, что молекулярная масса повышается. Однако, если до-

бавлено больше гистонов, соотношение $s/[\eta]$ заметно возрастает; это означает, что осевое отношение также понижается с увеличением количества связанного гистона. Следовательно, увеличение молекулярной массы при связывании гистонов сопровождается, возможно, некоторым складыванием ДНК.

Пример 13-Ж. *Обнаружение процесса впрыскивания ДНК фагами.* Фаги очень компактны по структуре и в связи с этим имеют для присущей им молекулярной массы очень низкую $[\eta]$. При обработке некоторыми реагентами (например, щелочными буферами, $NaClO_4$ и хлоридом гуанидиния) происходит резкое повышение $[\eta]$ вследствие освобождения ДНК. Это можно использовать для измерения степени впрыскивания ДНК частицами. Следует тем не менее отметить, что, поскольку метод вискозиметрии позволяет измерять усредненное свойство раствора, бывает не легко различить следующие случаи: 100% фагов впрыскивают половину своей ДНК и половина фагов впрыскивает всю свою ДНК. Следовательно, если ряд условий приводит к меньшей величине η, чем наблюдается при полном разрушении фагов, то полученную величину η трудно интерпретировать. Эти два случая, конечно, можно различить при помощи опытов по седиментации, поскольку коэффициент седиментации зависит от впрыснутого количества. Следовательно, в первом случае будет наблюдаться единственный коэффициент седиментации, величина которого будет меньше, чем в случае интактных фагов, но больше, чем в случае свободной ДНК, во втором случае будет наблюдаться два вида седиментирующего материала — фаг и свободная ДНК.

Измерение вязкоэластичности растворов ДНК

Молекулы ДНК бактерий имеют молекулярную массу больше $2 \cdot 10^9$, а в животных клетках он достигает 10^{11}. В таких пределах молекулярной массы использование гидродинамических методов затруднительно из-за сложных явлений, перечисленных в табл. 13-1. Заметьте, что описанный здесь метод вязкоэластичности не зависит от этих артефактов.

Если растворы ДНК подвергнуть напряжению сдвига, то молекулы ДНК растянутся, как показано на рис. 13-11. После снятия напряжения молекулы возвращаются в ненапряженную конфигурацию, при которой молекулы, если они очень длинные, приближаются к статистическому клубку. Раствор растягивающихся молекул обладает вязкоэластичностью, если его подверг-

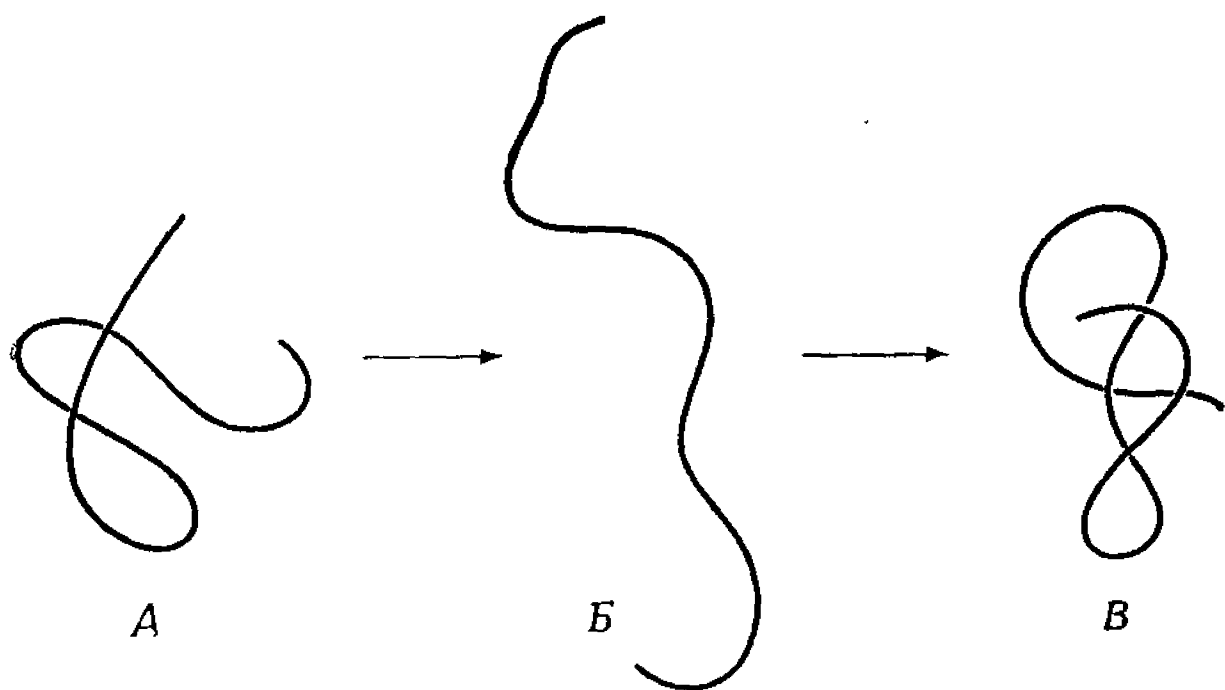


РИС. 13-11.

Растягивание молекулы ДНК, после которого происходит вязкоэластичная релаксация при удалении напряжения.

А — до приложения напряжения; *Б* — растяжение при напряжении сдвига; *В* — релаксация.

ТАБЛИЦА 13-1

Проблематичные явления, с которыми встречаются в различных гидродинамических методиках [a]

Явление	Седиментация	Вискозиметрия	Вязкоэластичность
Седиментация, зависящая от скорости	+	—	—
Агрегация, зависящая от напряжения	+	+	—
Деградация при сдвиге	+	+	—
Изменение при напряжении сдвига	—	+	—

[a] Знак плюс означает, что проблема существует, а знак минус — не существует.

нуть деформации сдвига в вискозиметре типа вискозиметра Куэтта. В случае модификации с погруженным ротором вискозиметра Зимма — Крозерса (рис. 13-8) после приложения напряжения сдвига внутренний цилиндр начинает вращаться. Когда напряжение сдвига снимают, то в том случае, если в вискозиметр налит чистый растворитель, угловая скорость постепенно приближается к нулю. Однако, если ротор помещен в раствор высокомолекулярной ДНК, направление вращения изменится на противоположное вследствие релаксации молекул ДНК, которые ранее были растянуты; в пределе ротор, конечно, остановится из-за трения. Экспоненциальная зависимость уменьшения скоро-

сти вращения ротора, который в конце концов остановится, может быть охарактеризована константой времени τ_R, называемой *временем запаздывания* (т. е. время, которое требуется для того, чтобы достичь $1/e$ от общего углового смещения, которое происходит при обращении движения). Когда τ_R экстраполируется к нулевой концентрации ДНК, такое время называют *временем релаксации* $\tau_R{}^0$, и оно является истинным молекулярным параметром, который может быть соотнесен с молекулярной массой. Вследствие недостаточно в настоящее время разработанной теории, M для линейных молекул ДНК лучше всего определять из эмпирического уравнения

$$M = 1{,}56 \cdot 10^8 (\tau^0_{R,\,в})^{0,60}, \tag{9}$$

в котором

$$\tau^0_{R,\,в} = \frac{\eta_{H_2O}}{\eta} \tau^0_R, \tag{10}$$

где η_{H_2O} и η — вязкости воды и растворителя соответственно, а все измерения проведены при 25°C. Для кольцевых молекул ДНК константа и показатель степени будут другими, но до сих пор они не оценены.

Большая польза этого метода заключается в том, что для растворов, содержащих молекулы различных размеров, наблюдаемая величина M соответствует *наибольшей* из присутствующих молекул (в отличие от того, что при измерениях $[\eta]$ получается усредненное значение). Следовательно, в случае очень хрупких молекул на систему не будет влиять распад части молекул.

ТАБЛИЦА 13-2

Размеры различных молекул ДНК, определенные при измерении вязкоэластичности[а]

Источник ДНК	Молекулярная масса	
	метод измерения вязкоэластичности	другие методы[б]
Фаг T7 *E. coli*	$25 \pm 2 \cdot 10^6$	$25 \cdot 10^6$
Фаг T2. *E. coli*	$109 \pm 6 \cdot 10^6$	$111 \cdot 10^6$
E. coli	$2{,}7 \cdot 10^9$	$2{,}6 \cdot 10^9$
Bacillus subtilis	$2{,}0 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^9 — 4 \cdot 10^9$
Drosophila melanogaster	$41 \pm 3 \cdot 10^9$	—
Drosophila americana	$79 \pm 10 \cdot 10^9$	—

[а] Данные взяты из *Klotz L. C.*, *Zimm B. H.*, J. Mol. Biol., 72, 779—800 (1972); *Kavenoff R.*, *Zimm B. H.*, Chromosoma, 41, 1—27 (1973); *Kavenoff R.*, *Klotz L. C.*, *Zimm B. H.*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 38, 1—8 (1973).

[б] Прочерк означает, что измерения другими методами не были проведены.

Оборудование для измерений вязкоэластичности пока не выпускается промышленностью, поэтому такая работа проводится только в лабораториях Бруно Зимма и его сотрудников. Этот метод был успешно применен для того, чтобы определить *M* для ДНК больших бактериофагов, некоторых бактерий и хромосом из некоторых видов плодовой мушки *Drosophila* (табл. 13-2). Этот метод, очевидно, получит в будущем большое распространение.

Список литературы

Eigner J., Molecular Weight and Conformation of DNA, in "Methods in Enzymology", vol. 12B, edited by L. Grossman and K. Moldave, Academic Press, 1968, pp. 386—429.

Uhlenhopp E. L., Zimm B. H., Rotating Cylinder Viscosimeters, in "Methods in Enzymology", vol. 21, edited by C. H. W. Hirs and S. N. Timasheff, Academic Press, 1973, pp. 483—491.

Yang J. T., The Viscosity of Macromolecules in Relation to Molecular Conformation, Advan. Protein Chem., **16**, 323—400 (1961).

Задачи

13-1. Характеристическая вязкость [η] ДНК равна 50 дл/г. При нагревании до 95°C в 0,01 *M* NaCl [η] падает до 20. При нагревании до 90°C в 0,5 *M* NaCl снижается до 3. Объясните зависимость от концентрации NaCl. Каких отличий следует ожидать, если нагревание проводить в растворах NaCl, содержащих 1 *M* формальдегида?

13-2. Если бактерии обработать некоторыми детергентами в низких концентрациях, суспензия становится заметно более вязкой. Если эту суспензию быстро отцентрифугировать, то получится осадок, который содержит всю ДНК и РНК. Надосадочная жидкость остается все еще вязкой. Какое объяснение можно предложить для этой вязкости?

13-3. Какие из следующих пар будут давать бóльшую вязкость при суспендировании в воде: а) две сферы с равными массами, но различными радиусами; б) твердая и пористая сфера, через которую может протекать растворитель; в) твердый и гибкий стержни; г) сфера и сфера с боковыми плоскостями?

13-4. Где молекула будет обладать большей относительной вязкостью, в воде или в 20%-ном глицерине?

13-5. Какая из следующих пар будет более устойчива к разрушению гидродинамическим сдвигом: а) линейная и кольцевая молекулы ДНК одинаковой длины; б) нативная линейная молекула ДНК и молекула, денатурированная в 1 *M* NaCl, имеющие одинаковую длину; в) линейная ДНК, денатурированная в 1 *M* и 0,01 *M* растворах NaCl, одной и той же молекулярной массы; г) ковалентная и перекрученная кольцевая ДНК одной и той же молекулярной массы.

13-6. Какие вы могли бы сделать заключения о структуре молекулы белка, если [η] увеличивается при измерениях в 6 *M* растворе хлорида гуанидиния? Если она уменьшается? Какой принципиальный источник неточности при высказывании этих заключений?

13-7. В общем случае вязкость повышается при добавлении различных солей в воду, это означает, что $\eta_{отн}>1$. Однако в нескольких случаях для разбавленных растворов $\eta_{отн}\leqslant 1$. Предложите возможное объяснение.

13-8. При некоторых значениях ионной силы и pH индивидуальный полинуклеотид обладает достаточно малой зависимостью $\eta_{уд}/c$ от c и $[\eta]$ почти не зависит от сдвига. При изменениях pH зависимость от концентрации и от сдвига заметно повышается так же, как истинное значение $[\eta]$. Каково возможное действие изменения pH?

13-9. Обычно в растворах нативной ДНК из-за жесткости молекулы наблюдается относительно небольшая зависимость $[\eta]$ от ионной силы. Однако отдельные препараты ДНК, выделенные из бактерий, обладают таким свойством, что при низкой ионной силе $[\eta]$ становится существенно меньше. Более того, если раствор разбавить прежде, чем понизить ионную силу, $\eta_{отн}$ оказывается выше, чем в том случае, если ионную силу понизили перед разбавлением раствора. Это не соблюдается для всех препаратов ДНК из этой бактерии. Какое возможное объяснение такого эффекта для данного образца?

13-10. Препарат суперспирализованной ДНК подвергли обработке, при которой с постоянной скоростью через каждые 30 мин происходит один одноцепочечный разрыв. В среднем требуется 10 таких одноцепочечных разрывов прежде, чем произойдет разрыв двойной спирали. Предположим, что измерения можно производить достаточно быстро, так что вязкость существенно не изменится за время измерения. Нарисуйте график зависимости $\eta_{отн}$ от времени.

V часть

СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

ГЛАВА 14

Абсорбционная спектроскопия

Молекулы поглощают свет. Длины волн, при которых происходит поглощение, и степень поглощения зависят от структуры и от окружения молекулы, поэтому абсорбционная спектроскопия является полезным инструментом для характеристики макромолекул различного размера.

Общая теория поглощения света молекулами

Световая волна состоит из взаимно перпендикулярных электрического и магнитного полей, амплитуды которых по мере распространения в пространстве изменяются по синусоиде (рис. 14-1).

Энергия волны E равна

$$E = \frac{hc}{\lambda} = h\nu, \quad (1)$$

где h — постоянная Планка, c — скорость света, λ — длина волны, ν — частота. Когда волна сталкивается с молекулой, она может либо *рассеиваться* (т. е. изменяется направление ее распространения), либо *поглощаться* (т. е. ее энергия передается молекуле). Относительная вероятность протекания того или иного процесса является свойством той молекулы, с которой произошло столкновение. Если произошло поглощение электромагнитной энергии света, о молекуле говорят, что она *возбуждена* или перешла в *возбужденное состояние.* Молекула или часть молекулы, которая может быть возбуждена посредством поглощения света в видимой и ближней УФ-области, называется *хромофо-*

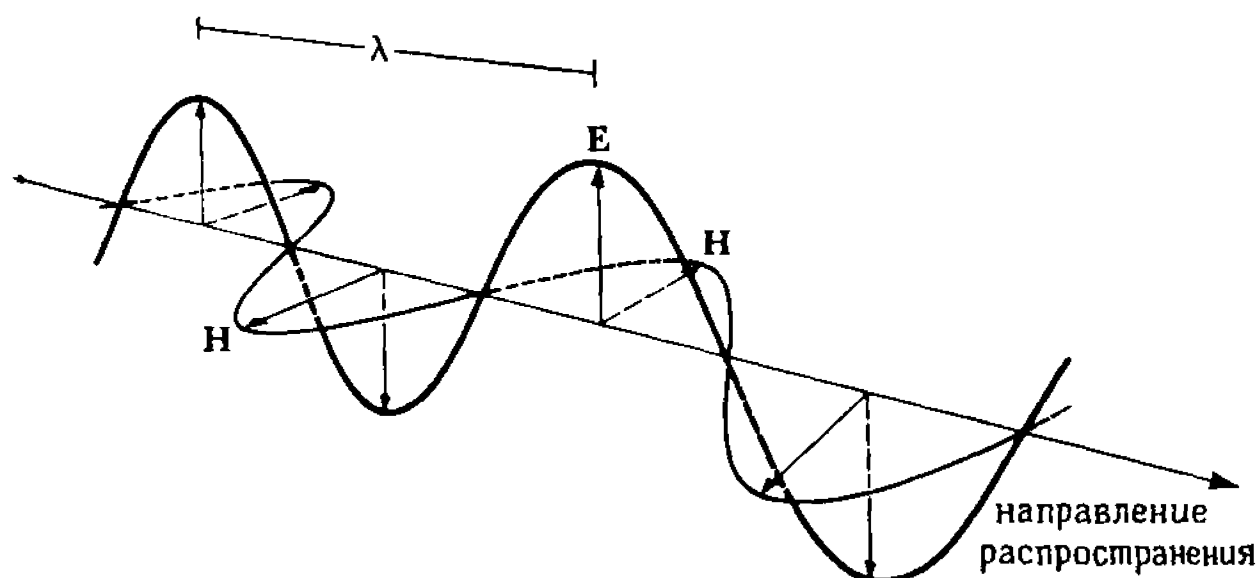


РИС. 14-1.

Распространение электромагнитной волны в пространстве. Векторы **E** и **H** все время взаимно перпендикулярны.

ром. Обычно энергия возбуждения превращается в тепло (кинетическую энергию) в результате столкновения возбужденной молекулы с другой молекулой (например, молекулой растворителя). В случае некоторых молекул она вновь излучается (в гл. 15 детально обсуждается механизм флуоресценции). В обоих случаях интенсивность света, прошедшего через молекулу, содержащую набор хромофоров, меньше интенсивности падающего света.

Возбужденная молекула обладает набором дискретных квантованных энергетических состояний, описываемых законами квантовой механики. Эти состояния называются *энергетическими* уровнями молекулы. Главные энергетические уровни определяются возможным пространственным распределением электронов и называются *электронными энергетическими уровнями;* на них накладываются *колебательные уровни,* которые указывают на различные типы колебаний молекулы [например, растягивание и изменение углов различных ковалентных связей]. Имеются и еще более близко расположенные уровни, называемые *вращательными,* но они не очень важны в абсорбционной спектроскопии и не будут обсуждаться. Все эти энергетические уровни обычно описываются *схемой энергетических уровней* (рис. 14-2). Самый низкий электронный уровень называется *основным состоянием,* а все другие — возбужденными.

Поглощение энергии происходит с наибольшей вероятностью только в том случае, если количество поглощенной энергии соответствует разности энергий квантованных состояний. Это можно выразить, констатируя, что свет с длиной волны λ поглощается только тогда, когда

$$\lambda = \frac{hc}{E_2 - E_1}, \qquad (2)$$

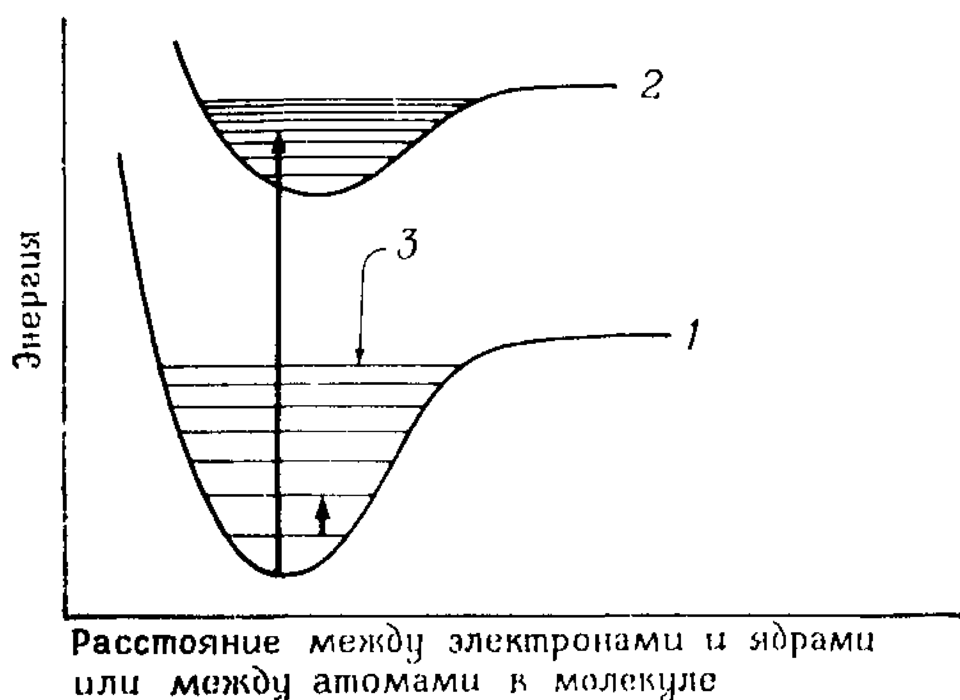


РИС. 14-2.

Типичная схема энергетических уровней, показывающая основное состояние (1) и первое возбужденное состояние (2). Тонкими горизонтальными линиями показаны колебательные уровни (3).

Длинная стрелка указывает на возможный электронный переход между основным состоянием и четвертым колебательным уровнем первого возбужденного состояния. Короткая стрелка означает переход с одного колебательного уровня на другой в пределах основного состояния.

где E_1 — энергетический уровень молекулы до поглощения, а E_2 — энергетический уровень, достигаемый в результате поглощения.

Изменение энергетического состояния при испускании или поглощении кванта называется *переходом*. Упрощенно переход между электронными энергетическими уровнями соответствует энергии, необходимой для перемещения электрона с одной орбитали на другую. На схеме* энергетических уровней переходы изображаются вертикальными стрелками. Зависимость вероятности поглощения от длины волны называется *спектром поглощения*. Задача абсорбционной спектроскопии состоит в накоплении и анализе данных по поглощению. Если бы все переходы происходили только между самыми низкими колебательными уровнями основного состояния и первого возбужденного состояния, тогда спектр поглощения состоял бы из узких, дискретных линий. Однако, поскольку возможны переходы с основного состояния на любой колебательный и вращательный уровни первого возбужденного состояния, а линии имеют конечную ширину, то спектр проявляется в виде относительно плавной кривой (рис. 14-6). Для большинства молекул длины волн, соответствующие переходам между основным состоянием и любым колеба-

* Далеко не все переходы происходят с высокой вероятностью; в реальных системах действуют определенные ограничения, или *правила отбора* квантовой механики. Эти правила не будут здесь обсуждаться.

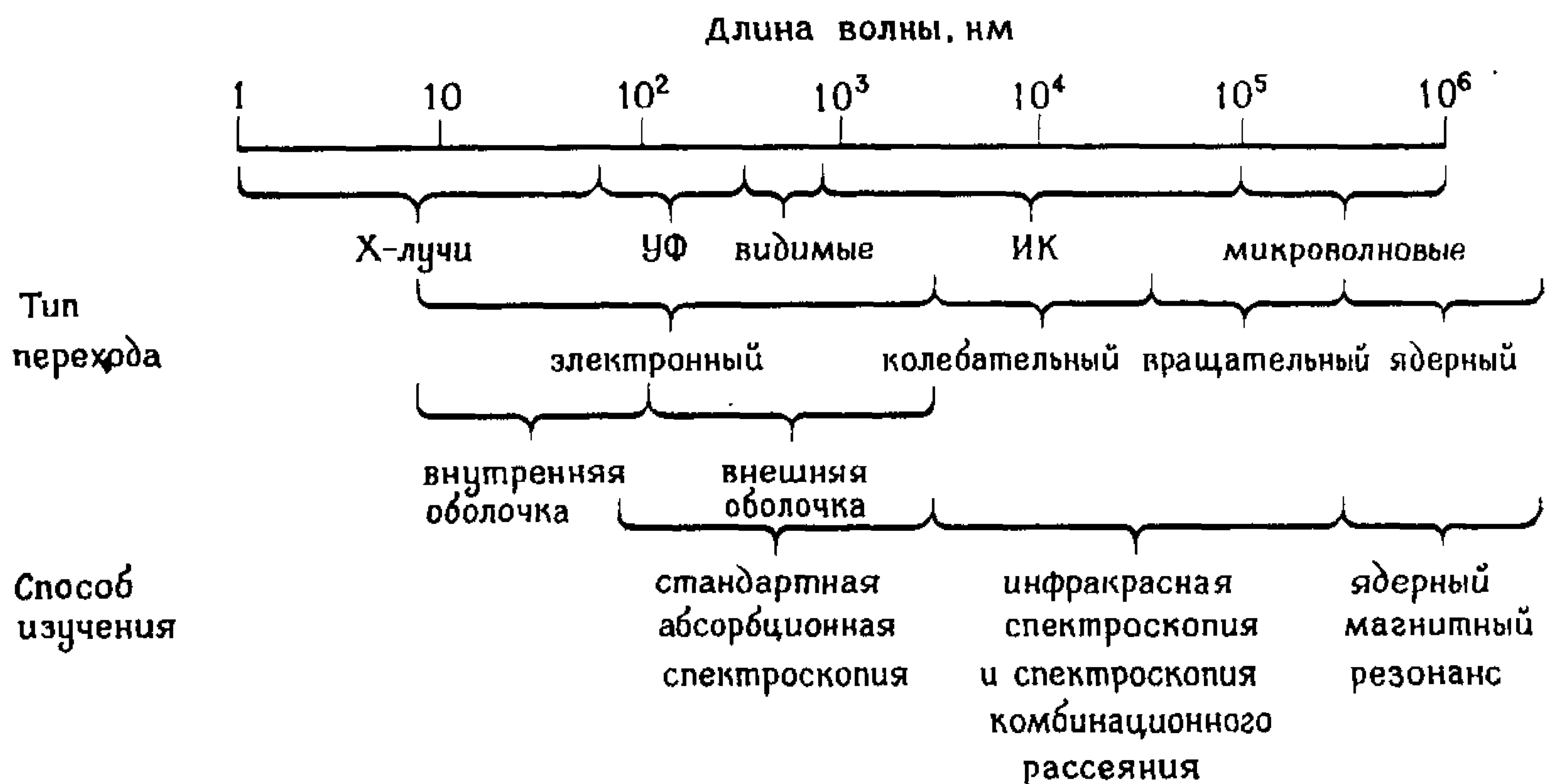


РИС. 14-3.

Часть электромагнитного спектра, используемая для исследований в области физической биохимии.

тельным уровнем первого возбужденного состояния, лежат в ультрафиолетовой и видимой области спектра. Возможны также низкие по энергии переходы между колебательными уровнями в пределах одного электронного уровня. Эти переходы происходят в результате поглощения излучения в *инфракрасной области*. На рис. 14-3 показана часть электромагнитного спектра, представляющая интерес для биохимиков, и обозначены переходы, которые возникают при поглощении излучения в различных диапазонах частот.

Вероятность перехода при одной длине волны характеризуется *молярным коэффициентом погашения** при этой длине волны. Чтобы определить этот параметр, рассмотрим, как он измеряется. Если свет интенсивности I_0 проходит через раствор с толщиной слоя d и концентрацией c, интенсивность прошедшего света I подчиняется закону Ламберта — Бера:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon dc}, \text{ т. е. } \lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = -\varepsilon dc \text{ или } \lg\frac{I_0}{I} = \varepsilon dc, \tag{3}$$

где ε — молярный коэффициент погашения (экстинкции). Результаты измерения выражают либо как *процент пропускания* $(100 \times \frac{I}{\ })$, либо, гораздо чаще, как *поглощение А* $(\lg\frac{I_0}{I})$. Когда $d = 1$ см, A называют OD_λ или *оптической плотностью***, ин-

* Коэффициент погашения ε называют молярным, если концентрация раствора выражена в г-моль/л, а толщина слоя в сантиметрах. — *Прим. перев.*

** В отечественной литературе оптической плотностью называется величина $\lg\frac{I_0}{I}$, которая обозначается буквами A или D. Далее мы используем обозначение D. — *Прим. перев.*

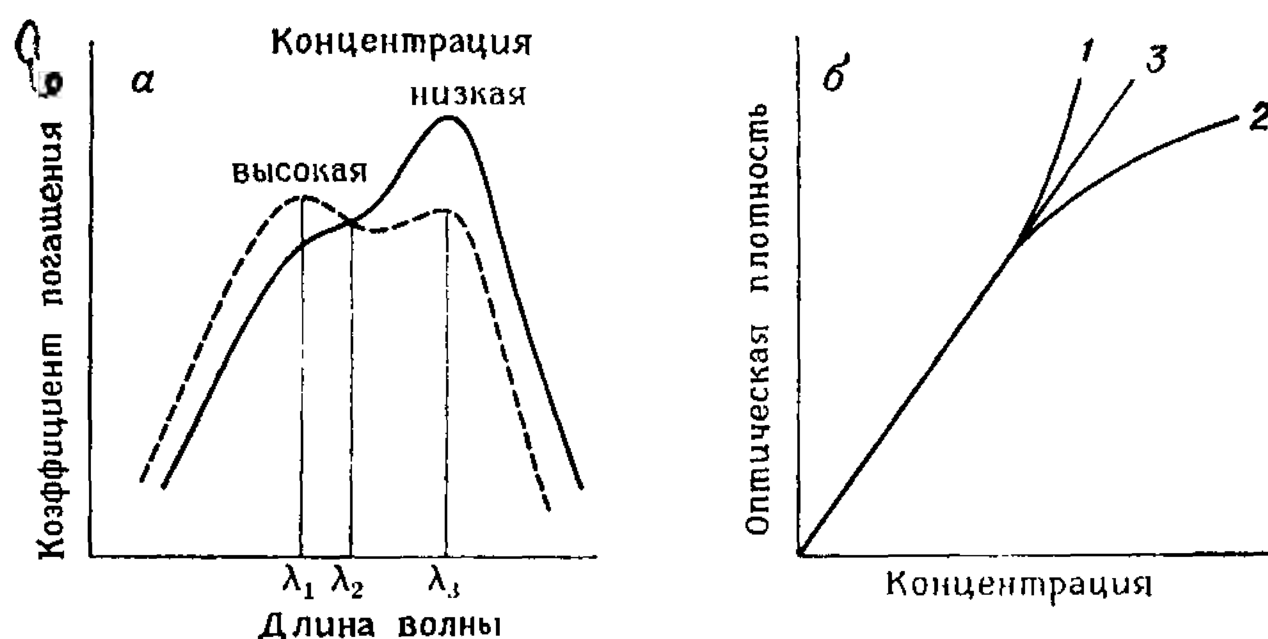


РИС. 14-4.

Положительное и отрицательное отклонение от закона Бера и причины отклонений.

а — спектральный сдвиг, связанный с возрастанием концентрации, часто в результате полимеризации. Отметим, что при длине волны λ_2 не наблюдается изменения молярного коэффициента погашения при изменении концентрации. Эта длина волны соответствует изобестической точке. *б* — кривая, показывающая отклонения от закона Бера. При λ_1 отклонение положительное (*1*), при λ_3 — отрицательное (*2*). В изобестической точке при λ_2 закон всегда соблюдается (*3*).

декс λ указывает длину волны, при которой проводится измерение. Оптической плотностью удобно пользоваться, так как она равняется $\varepsilon \times c$. В некоторых случаях, если c велико, ε становится функцией c, и тогда можно сказать, что закон Бера * нарушается. Это может быть результатом рассеяния света или структурных изменений (например, димеризации, агрегации или химических изменений) при высоких концентрациях (рис. 14-4).

Аппаратура для измерения поглощения в видимом и ультрафиолетовом свете

Измерение поглощения осуществляют с помощью *спектрофотометра*. (При описании биохимических образцов почти всегда имеются в виду растворы этих образцов.) Несмотря на различия в конструкции, все спектрофотометры состоят из источника света, монохроматора (для выделения определенной длины волны), прозрачной кюветы, куда помещается образец, детектора света и измерительного прибора или самописца для регистрации выходного сигнала детектора (рис. 14-5). Ход работы обычно сле-

* Закон Ламберта — Бера почти всегда называют законом Бера, хотя это не совсем правильно (имеется другой закон Бера).

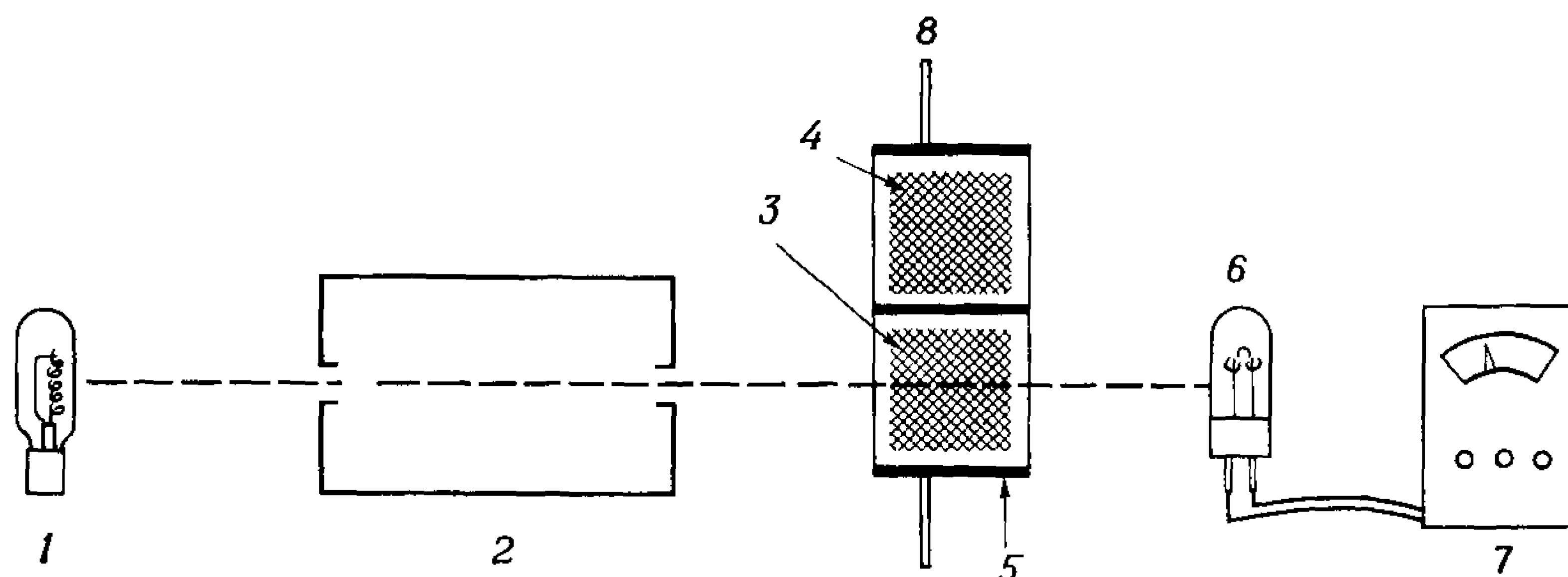


РИС. 14-5.

Схематическое устройство спектрофотометра.

Свет от лампы 1 проходит через монохроматор 2 для выделения пучка света с определенной длиной волны. Образец 3 и растворитель 4 содержатся в двух кюветах, помещенных в держатель кювет 5. Свет проходит через кювету и падает на фотоэлемент 6, выходной сигнал которого регистрируется измерительным прибором 7. Держатель кюветы находится на направляющих 8, так что каждая кювета может быть независимо помещена в пучок лучей.

дующий: измеряют при одной длине волны интенсивность света, прошедшего через растворитель (который может быть буфером), затем следует измерение интенсивности света, прошедшего через раствор изучаемого вещества в том же растворителе. Далее фиксируется изменение в интенсивности света, по которому можно судить о поглощении растворенного вещества. На практике прибор настраивают таким образом, чтобы он показывал нулевое поглощение при измерении одного растворителя (это называется настройкой прибора на нуль). Осуществив такую настройку, можно снимать показания, соответствующие непосредственно поглощению образца. Для получения спектра эта операция повторяется при многих длинах волн. Некоторые приборы, называемые автоматическими двухлучевыми регистрирующими спектрофотометрами, позволяют осуществлять развертку длин волн и одновременно измерять поглощение образца и растворителя (которые находятся в различных кюветах) и фиксировать с помощью электронного оборудования суммированный поток излучений. При этом на самописце вычерчивается спектр. Эти приборы очень дорогие, но они оправдывают себя при проведении большого количества спектральных анализов.

Параметры, измеряемые в абсорбционной спектроскопии

На рис. 14-6 показаны спектры, снятые в видимой и УФ-областях для двух биологических молекул. Обычно определяются величины D или ε. Длина волны, соответствующая максимуму погло-

щения, называется $\lambda_{макс}$, и именно при этой длине волны обычно определяют ε. Некоторые полосы поглощения состоят из многочисленных пиков, и часто регистрируют длины волн, соответствующие пикам, имеющим меньшие молярные коэффициенты погашения. Эти длины волн иногда также называют $\lambda_{макс}$ или указывают, что вещество имеет максимумы поглощения при λ_1, λ_2, ..., λ_n.

Иногда измеряют ширину полосы, хотя и не обязательно.

В табл. 14-1 * приведен список величин $\lambda_{макс}$ и ε хромофоров, часто встречающихся в биологических объектах.

ТАБЛИЦА 14-1

Максимумы поглощения $\lambda_{макс}$ и молярные коэффициенты погашения ε различных веществ при нейтральных значениях pH, используемых для биологических исследований

Соединение	$\lambda_{макс}$, нм	ε при $\lambda_{макс}$ ($\times 10^{-3}$)
Триптофан[a]	280	5,6
	219	47,0
Тирозин[a]	274	1,4
	222	8,0
	193	48,0
Фенилаланин[a]	257	0,2
	206	9,3
	188	60,0
Гистидин[a]	211	5,9
Цистеин[a]	250	0,3
Аденин	260,5	13,4
Аденозин	259,5	14,9
Гуанин	246	10,7
Гуанозин	252,5	13,6
Цитозин	267	6,1
Цитидин	271	9,1
Урацил	259,5	8,2
Уридин	261,1	10,1
Тимин	264,5	7,9
Тимидин	267	9,7
ДНК	258	6,6
РНК	258	7,4

[a] Поглощение других аминокислот незначительно.

* Отметим, что длина волны выражается в нанометрах (нм). В более ранней литературе, а иногда и сейчас используют миллимикроны (ммк). Некоторые старые приборы прокалиброваны в ангстремах (Å). 1 нм = 1 ммк = = 10Å = 10^{-9} м.

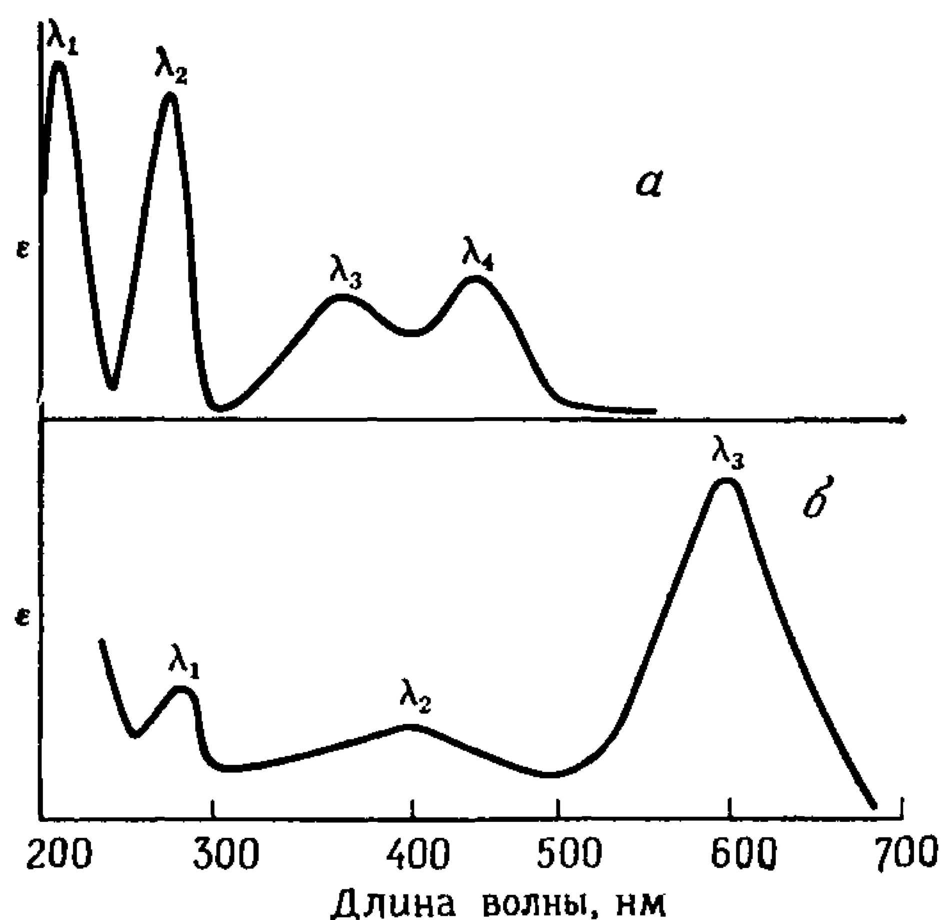


Рис. 14-6.

Сравнение спектров поглощения двух биологических молекул: флавинмононуклеотида (*а*) и фикоцианина (б). Спектры можно использовать для идентификации соединения.

Факторы, влияющие на абсорбционные свойства хромофора

Спектр поглощения хромофора определяется в первую очередь химической структурой молекулы. Однако $\lambda_{макс}$ и ε претерпевают заметные изменения и под влиянием окружения. Имеется в виду влияние pH, полярности растворителя или соседних молекул и относительная ориентация соседних хромофоров. Именно эти факторы лежат в основе использования абсорбционной спектроскопии для характеристики макромолекул.

Влияние окружения состоит в следующем.

Эффект pH. pH раствора определяет ионную форму ионизуемых хромофоров. На рис. 14-7 показан пример, иллюстрирующий влияние pH на спектр тирозина.

Эффект полярности. В случае полярных хромофоров часто справедливо (особенно если молекула содержит O, N или S), что $\lambda_{макс}$ наблюдается при более коротких длинах волн в полярных растворителях, содержащих гидроксил (H_2O, спиртах), чем в неполярных. Пример приведен на рис. 14-8.

Эффекты ориентации. Величины $\lambda_{макс}$ и ε существенно зависят от геометрических особенностей молекул. Наиболее известна *гипохромия* нуклеиновых кислот, т. е. понижение коэффициента погашения нуклеотида, при условии, что нуклеотид входит в состав одноцепочечного полинуклеотида, в котором нуклеиновые основания сближены и расположены друг над другом. Дальней-

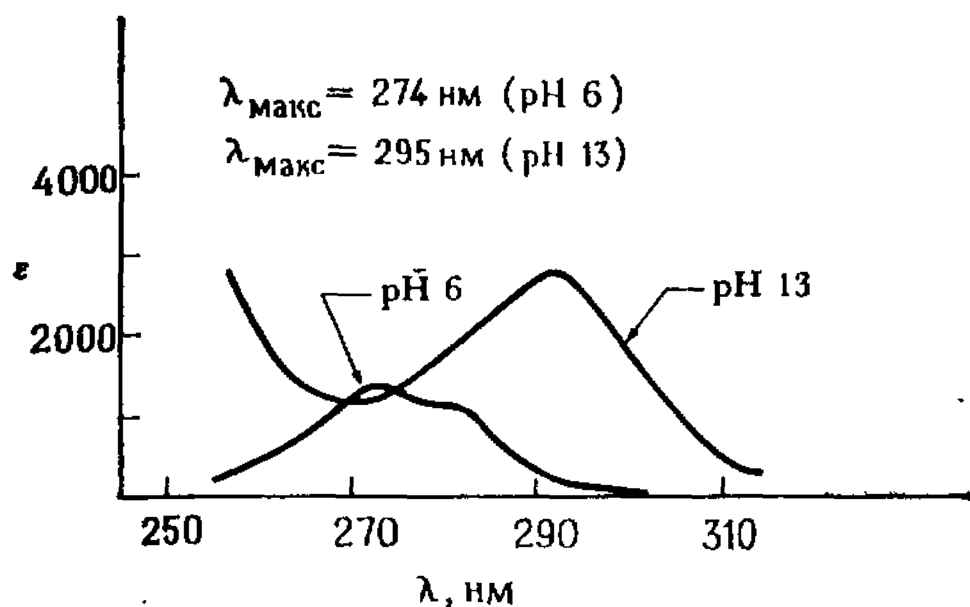


РИС. 14-7.

Спектр поглощения тирозина при pH 6 и 13. Отметим, что, как $\lambda_{макс}$, так и ε возрастают при диссоциации OH-группы фенольного остатка.

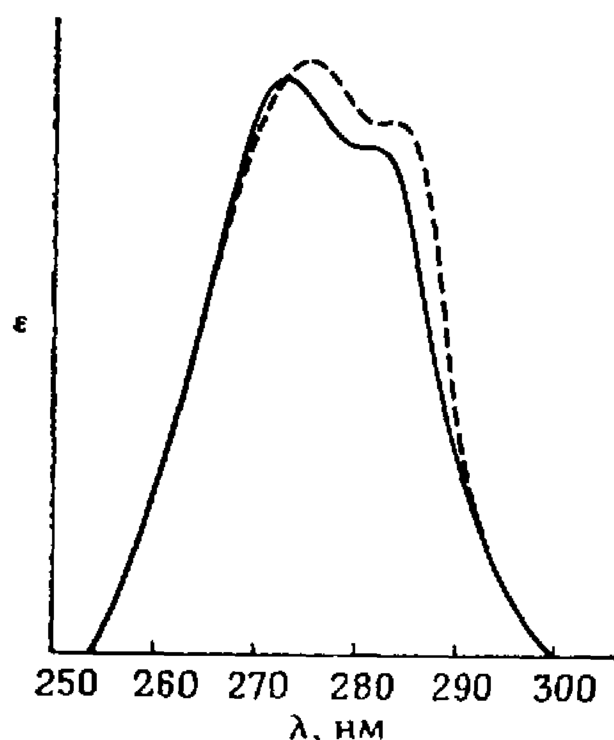


РИС. 14-8.

Влияние полярности растворителя на спектр поглощения тирозина.

Растворители: вода (сплошная линия) и 20%-ный этиленгликоль (штриховая линия). Отчетливо видно возрастание $\lambda_{макс}$ в менее полярном растворителе.

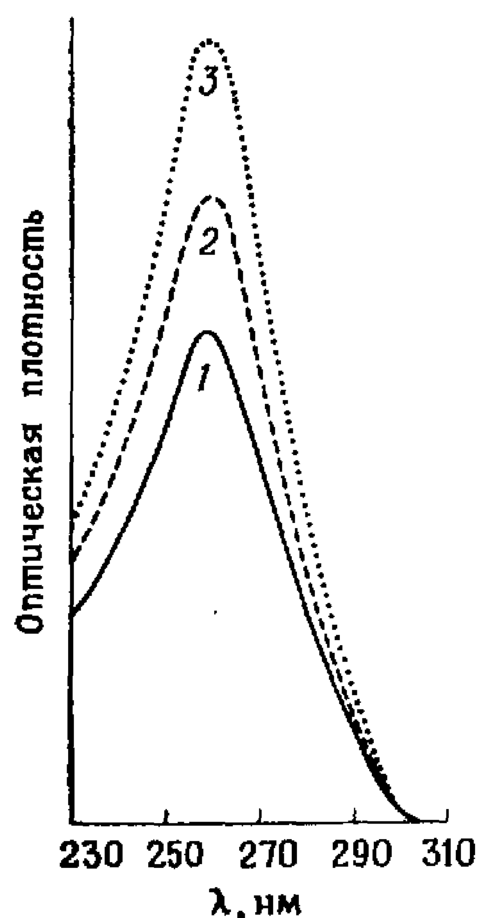


РИС. 14-9.

Спектры поглощения ДНК фага T7 в двухцепочечной (*1*) и одноцепочечной (*2*) формах, а также после гидролиза до свободных нуклеотидов (*3*), показывающие понижение оптической плотности (гипохромию), которое сопровождает образование более упорядоченной структуры. Спектры получены при одинаковой концентрации.

шее понижение ε наблюдается для двухспиральных полинуклеотидов, так как основания в этом случае еще более упорядочены. Это показано на рис. 14-9.

В результате исследований большого числа биологически важных соединений и макромолекул, структура которых хорошо известна для различных условий, собран ряд эмпирических фактов, которые могут быть названы рабочими правилами абсорбционной спектроскопии в биохимии. Они приведены в табл. 14-2. Примеры использования этих правил будут даны в разделах следующего параграфа.

ТАБЛИЦА 14-2

Эмпирические правила интерпретации спектров поглощения биологических макромолекул

1. Если аминокислоты: триптофан, тирозин, фенилаланин и гистидин—перемещаются в менее полярное окружение, $\lambda_{макс}$ и ε возрастают. Следовательно:

а. Если в снятом в полярном растворителе спектре аминокислоты, находящейся в составе белка, наблюдаются бо́льшие $\lambda_{макс}$ и ε, чем эти же величины для свободной аминокислоты в том же растворителе, то эта аминокислота находится во внутренней области белка («спрятана») и окружена неполярными аминокислотами.

б. Если спектр белка чувствителен к изменению полярности растворителя, аминокислота, для которой наблюдаются изменения $\lambda_{макс}$ и ε, должна располагаться на поверхности белка.

2. В случае аминокислот $\lambda_{макс}$ и ε всегда возрастают, когда титруемая группа (например, OH тирозина и SH цистеина) заряжена. Следовательно:

а. Если не наблюдается изменений в спектре одной из этих аминокислот, а pH таково, что должна бы происходить ионизация свободной аминокислоты, то она должна быть спрятана в неполярной области молекулы белка.

б. Если значение p*K* ионизуемой группы аминокислоты, определенное по изменению спектра при изменении pH, такое же, как для свободной аминокислоты в растворе, то эта аминокислота находится на поверхности белка.

в. Если значение p*K*, определенное по изменению спектра при изменении pH, существенно другое, то эта аминокислота, вероятно, находится в очень полярном окружении (например, тирозин, окруженный карбоксильными группами).

3. Величина ε пуринов и пиримидинов понижается по мере того, как плоскости их колец становятся параллельными и кольца сближаются друг с другом (по мере увеличения стэкинга). Величина ε понижается в следующем ряду: свободное основание > основание в составе одноцепочечного полинуклеотида, не имеющего стэкинга, > основание в составе одноцепочечного полинуклеотида со стэкингом > основание в составе двухцепочечного полинуклеотида.

Применение абсорбционной спектроскопии в видимой и УФ-областях спектра

Измерение поглощения проводится для многих целей: определения концентрации вещества, анализа некоторых химических реакций, идентификации веществ и определения структурных параметров макромолекул. Все эти области применения рассматриваются в следующих примерах.

Пример 14-А. *Измерение концентрации.* Наиболее часто измерения поглощения проводят для определения концентрации. Это можно делать, если известен молярный коэффициент погашения и соблюдается закон Бера. Например, для двухцепочечной ДНК $D_{260}=1$ соответствует 50 мкг/мл (эта величина зависит от нуклеотидного состава) *. Поскольку закон Бера соблюдается по крайней мере до $D=2$ (которая приближается к пределу для большинства спектрофотометров), легко подсчитать концентрацию, а именно: D, равная 0,5, соответствует 25 мкг/мл, D, равная 0,1, соответствует 5 мкг/мл и т. д.

Иногда исследуемый материал состоит из частиц, поглощающих свет и образующих скорее суспензию, чем раствор; например, в случае бактериофагов, поглощение почти целиком определяется содержанием в них ДНК. Бактериофаги не только поглощают, но также рассеивают свет (рэлеевское рассеяние) и, следовательно, могут иметь искусственно завышенное поглощение. Однако, измеряя поглощение при ряде длин волн, далеких от $\lambda_{макс}$, можно сделать поправку на рассеяние. Так как рассеяние изменяется пропорционально λ^{-4}, можно построить зависимость измеряемого поглощения от λ^{-4} и, экстраполируя линейную часть этой кривой (где все наблюдаемое поглощение обусловлено рассеянием) к $\lambda_{макс}$, внести поправку в измеряемое поглощение, равную величине, обусловленной рассеянием. Пример такой поправки показан на рис. 14-10. Это удобный метод определения содержания нуклеиновой кислоты в бактериофагах; учитывается также то, что D_{260} (с поправкой на рассеяние) $=1$ соответствует концентрации ДНК 50 мкг/мл.

Концентрацию бактерий также часто определяют спектрофотометрически, хотя при используемых длинах волн все кажущееся поглощение обусловлено рассеянием. В этом случае вместо поправки на рассеяние проводится сопоставление наблюдаемой оптической плотности с количеством жизнеспособных клеток и строится калибровочная кривая. Таким путем, как показано

---

* Для ДНК, содержащей 40% G·C-пар, $D_{260}=1$ соответствует 40 мкг/мл.— *Прим. ред.*

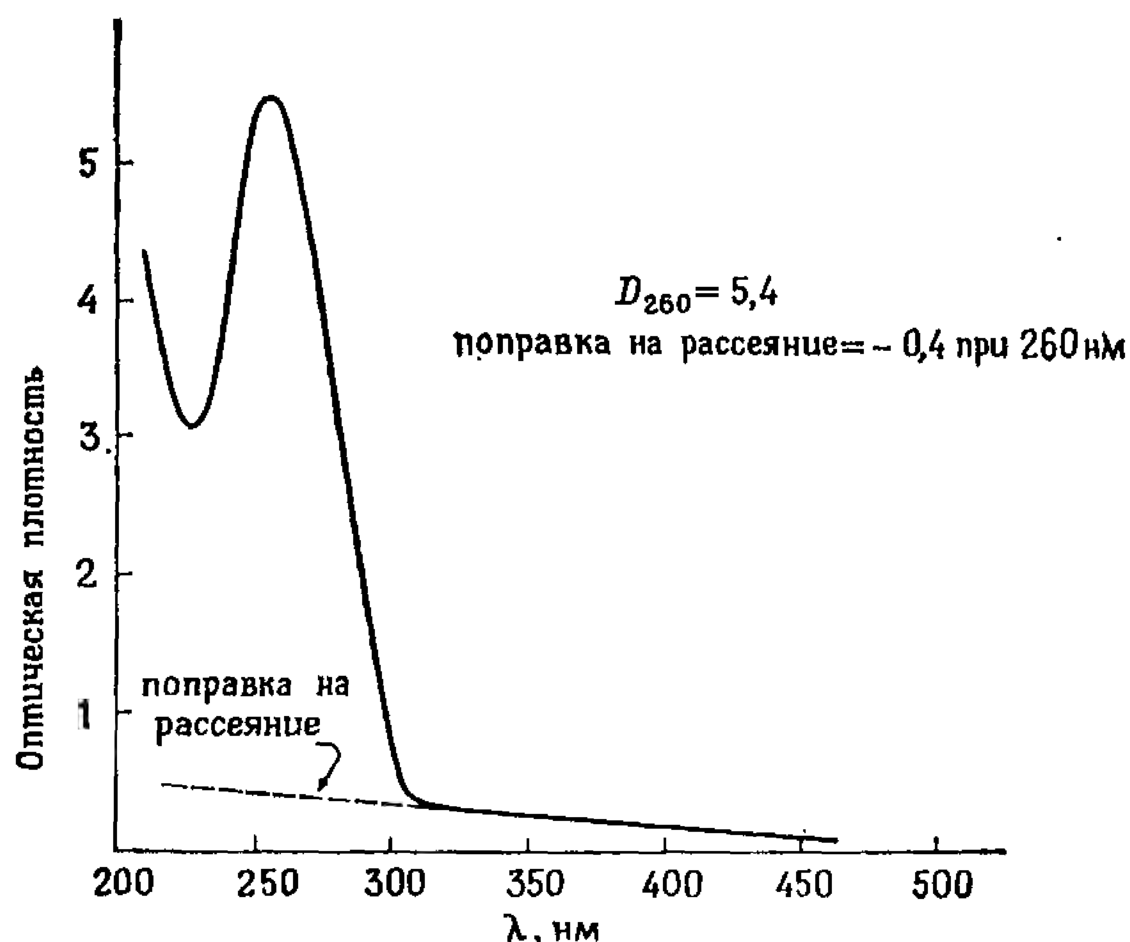


РИС. 14-10.

Спектр поглощения фага Т7 *E. coli.* Показана поправка на рэлеевское рассеяние.

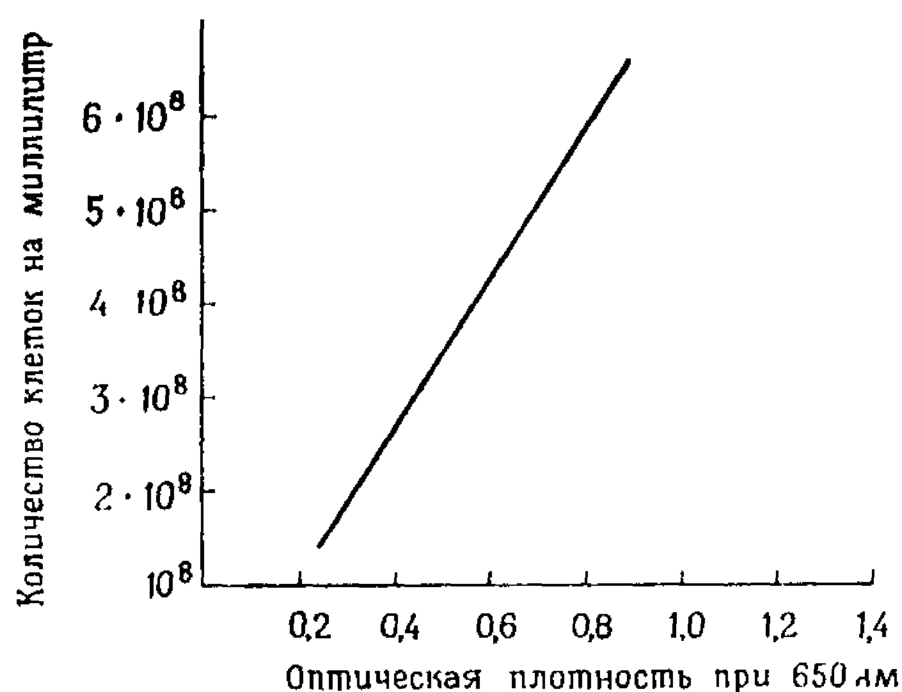


РИС. 14-11.

Концентрация бактерий, определенная путем измерения оптической плотности.

на рис. 14-11, удается точно определить концентрацию клеток или сухой массы на единицу объема.

Пример 14-Б. *Исследование химических реакций.* В ходе реакции должно изменяться поглощение одного из реагентов. В качестве примера из энзимологии рассмотрим измерение активности фермента β-галактозидазы. Эта методика широко используется в молекулярной биологии при изучении функционирования лактозного оперона. Этот фермент расщепляет *о*-нитрофенилгалактозид (ОНФГ) с образованием *о*-нитробензола, который можно определить по его поглощению при 420 нм. Так как, по крайней

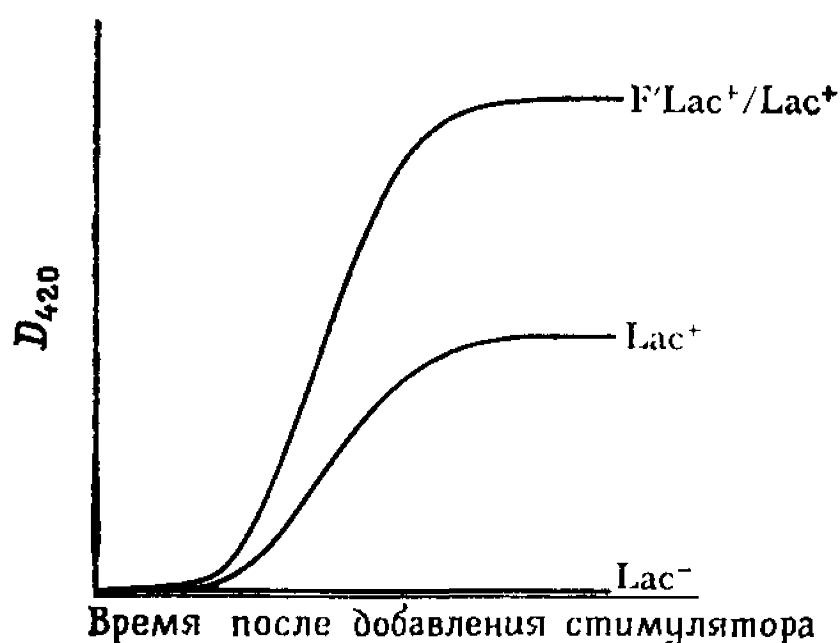


РИС. 14-12.

Изучение синтеза β-галактозидазы путем измерения D_{420} продукта гидролиза *о*-нитрофенилгалактозида (ОНФГ). Три культуры, Lac^-, Lac^+ и диплоид, содержащий две копии генов lac, выращивались в глицерин-солевой среде. При $t=0$ был добавлен стимулятор синтеза β-галактозидазы. Через различные промежутки времени брали пробы и обрабатывали толуолом для того, чтобы убить клетки и отделить фермент; затем был добавлен ОНФГ. Через тридцать минут была измерена D_{420}. В результате этого опыта показано, что клетки Lac^- не продуцируют фермент, а диплоид продуцирует приблизительно в два раза больше, чем гаплоид.

мере в некотором интервале, скорость реакции пропорциональна концентрации фермента, из наклона кривой зависимости D от времени гидролиза (рис. 14-12) можно определить количество фермента.

Другой пример — ферментативный гидролиз полинуклеотидов. Согласно правилу *3* табл. 14-2, ε (свободного основания) >ε (основания в полинуклеотиде). Отсюда, если полинуклеотид гидролизуется до мононуклеотидов, то ε_{260} возрастает. Следовательно, если к образцу полинуклеотида добавить нуклеазу и измерить D_{260} как функцию времени, D_{260} будет возрастать, и это возрастание указывает на гидролиз. Как и в случае β-галактозидазы, из наклона кривой зависимости D_{260} от времени можно определить количество нуклеазы.

Третий пример — определение мощности дозы рентгеновской установки. Если облучить рентгеновскими лучами раствор $FeSO_4$ в H_2SO_4, ион Fe^{2+} превращается в Fe^{3+}, который можно определить по его поглощению при 305 нм. Из величины D_{305} можно рассчитать общую полученную дозу излучения.

Пример 14-В. *Идентификация веществ путем спектральных измерений.* Большинство веществ имеют характерные спектры поглощения и могут быть идентифицированы с их помощью. Для этого измеряют полный спектр либо отношение поглощений при различных длинах волн. Например, в первых работах по опре-

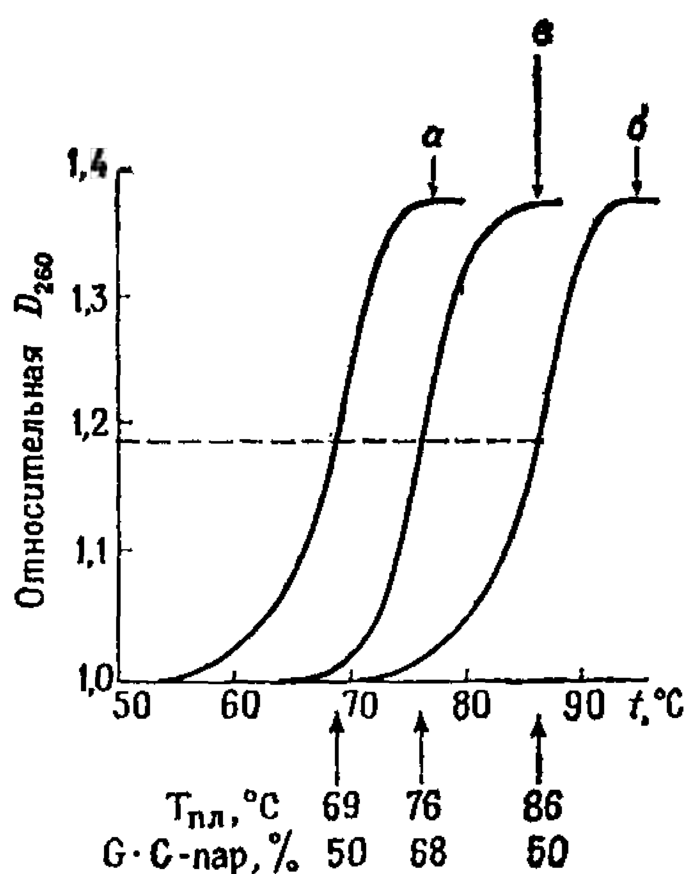


РИС. 14-13.

Зависимость оптической плотности трех растворов ДНК от температуры.

а — ДНК *E. coli* (50% G·C) в 0,01 M фосфатном буфере, pH 7,8; *б* — то же в 0,1 M фосфатном буфере, pH 7,8; *в* — ДНК *Pseudomonas aeroginosa* (68% G·C) в 0,01 M фосфатном буфере, pH 7,8. Температура, при которой изменение поглощения составляет 50% от своей максимальной величины, называется температурой плавления $T_{пл}$. Отметим, что $T_{пл}$ возрастает с увеличением ионной силы раствора и содержания G·C-пар.

делению нуклеотидного состава ДНК ее гидролизовали и основания разделяли хроматографически. Затем идентифицировали индивидуальные основания, получая их спектры и отмечая $\lambda_{макс}$ (в нм): 260,5 для аденина; 264,5 для тимина; 246 для гуанина и 267,0 для цитозина. Чтобы избежать получения полного спектра (для этого необходим автоматический регистрирующий спектрофотометр), воспользовались тем, что основания можно различить, измеряя отношение D_{250}/D_{280}. Это отношение составляет 2,00; 1,26; 1,63; 0,31 для аденина, тимина, гуанина и цитозина соответственно. После идентификации оснований было определено количество каждого из них; для этого, как в примере 14-А, измеряли оптическую плотность, так как величины ε при $\lambda_{макс}$ ($13{,}4\cdot10^3$, $7{,}9\cdot10^3$, $10{,}7\cdot10^3$ и $6{,}1\cdot10^3$ соответственно) известны. [Например, если D_{260} аденина была 0,65, молярная концентрация составила бы $0{,}65/(13{,}4\cdot10^3)=4{,}9\cdot10^{-5}$ M.]

Пример 14-Г. *Переход спираль — клубок в двухцепочечной ДНК: денатурация и ренатурация.* D_{260} ДНК возрастает, если ДНК нагревается в определенном интервале температур (рис. 14-13). Эта так называемая *гиперхромия* является критерием денатурации или перехода спираль — клубок и возникает в результате нарушения стэкинга оснований ДНК, при разделении двух полинуклеотидных цепей (см. правило *3* в табл. 14-2). Таким образом, с помощью простого оптического метода удается определить устойчивость ДНК к воздействию температуры, pH, ионной силы, к добавлению малых молекул, варьированию полярных и неполярных растворителей. Как видно из следующих примеров, этот метод явился мощным средством установления некоторых важнейших свойств ДНК. Во-первых, термическая устойчивость ДНК возрастает с увеличением содержания пар

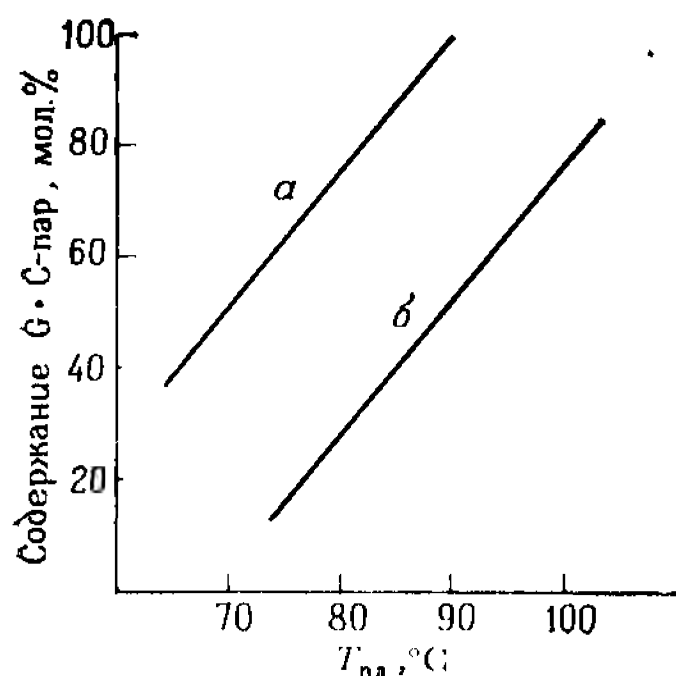


РИС. 14-14.

График зависимости $T_{пл}$ от содержания G·C-пар в молекулах различных ДНК. Показаны величины $T_{пл}$ для двух различных значений ионной силы. Отметим, что наклон кривых одинаков. [Из *Marmur J., Doty P.*, J. Mol. Biol., 5, 109—118 (1962).]

а — 0,01 М фосфатный буфер + 0,001 М EDTA; *б* — 0,15 М NaCl + 0,015 М цитрат Na.

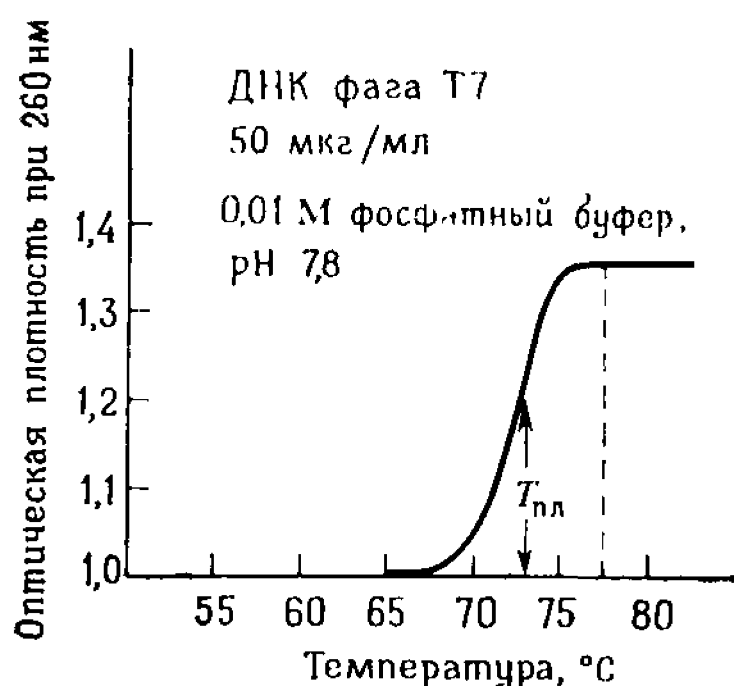


РИС. 14-15.

Кривые плавления раствора ДНК, полученные путем измерения D_{260} в зависимости от температуры (сплошная линия) или путем нагревания ДНК до определенной температуры (ниже 77,5°С), охлаждения до 25°С и последующего измерения D (та же линия). Температура, при которой происходит разделение цепей, находится в месте пересечения штриховой линии с осью абсцисс.

гуанин — цитозин (рис. 14-14). Следовательно, пара оснований гуанин — цитозин связана, по-видимому, более прочно водородными связями, чем пара аденин — тимин. Во-вторых, если температура возрастает (но не до величины, соответствующей максимальному поглощению) и затем понижается до температуры, ниже которой D не изменяется, тогда D немедленно падает до своей первоначальной величины. Это указывает на то, что при неполном разделении цепей нативная структура легко восстанавливается (рис. 14-15). При наличии межцепочечной ковалентной связи (что является особым случаем) поглощение всегда падает до своей обычной величины. В-третьих, разделения цепей не происходит, пока не будет полностью пройдена область перехода (например, 77,5°С, рис. 14-15), что можно не заметить, по-

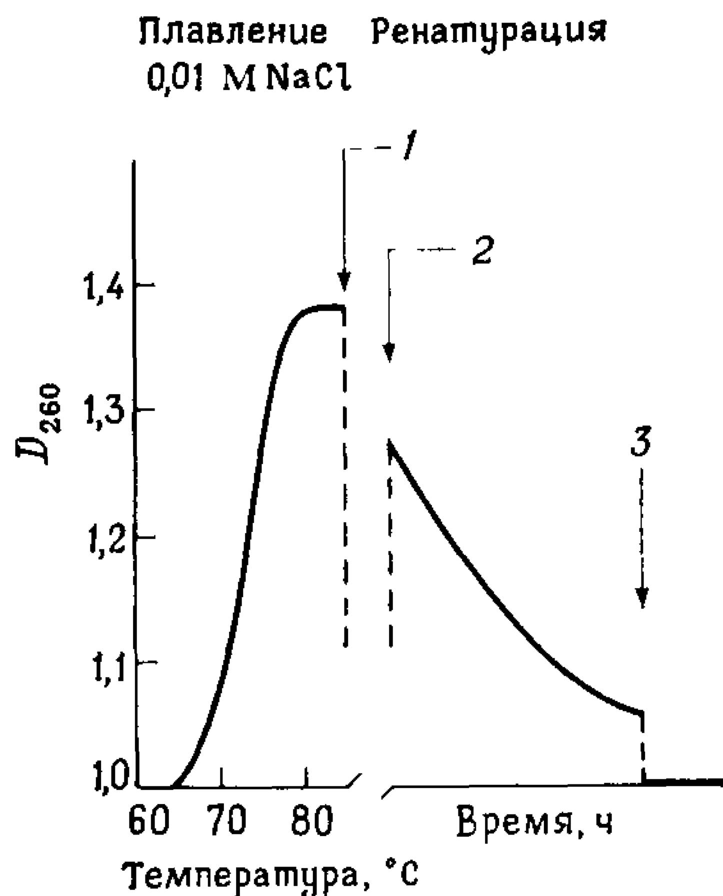


РИС. **14-16.**

Обнаружение ренатурации ДНК фага Т7 путем измерения D_{260}.

Вначале ДНК была денатурирована в 0,01 М NaCl. При доведении концентрации NaCl до 0,5 М и понижении температуры до 20°C (*1*) беспорядочно образуются водородные связи и величина D_{260} падает. Когда температура повышается до 76°C (*2*), случайно возникшие пары оснований разрушаются и *D* возрастает. Начинается образование правильных пар оснований. Поскольку температура ниже той, которая необходима для разделения цепей, *D* понижается. Однако ДНК частично денатурирована при этой температуре. Когда температура понижается до 20°C (*3*), все водородные связи восстанавливаются и ренатурация считается завершенной.

скольку разделение нескольких последних пар оснований вносит совсем незначительный вклад в общее изменение поглощения. В-четвертых, если нагреть ДНК выше температуры, при которой происходит разделение цепей, и затем охладить, возрастание поглощения в условиях высокой ионной силы (0,1) при последующем нагревании уменьшается от 37% (т. е. максимальной величины) до 12%, так как новые водородные связи (внутри- и межцепочечные) формируются беспорядочным образом. Следовательно, при высокой ионной силе денатурированная ДНК агрегирует. Если ионная сила низка (0,01), то сохраняется максимальная величина *D*, потому что из-за отталкивания фосфатных групп цепи остаются разделенными. В-пятых, если ДНК, для которой наблюдается увеличение *D* на 12%, выдержать в интервале ионной силы от 0,5 до 1,0 и при более высокой температуре, чем $T_{пл}$, отвечающая половине перехода (рис. 14-16), то через несколько часов *D* примет свою первоначальную величину; при этом концентрация ДНК должна быть высокой. Этот процесс называется *ренатурацией* и представляет собой возвращение к нативной двухцепочечной структуре (см. гл. 1 и 18).

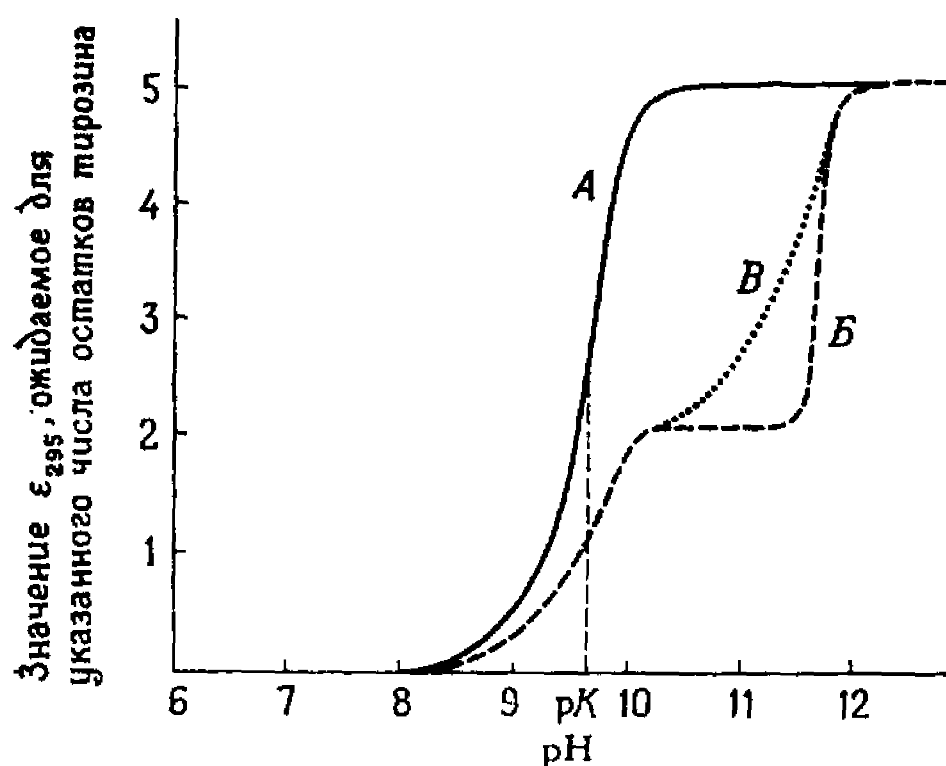


РИС. 14-17.

Кривые титрования тирозина, при построении которых использовали ε_{295}. Гипотетический белок содержит 5 тирозиновых остатков.

А — все пять остатков находятся на поверхности. *Б* — два остатка на поверхности, а три — внутри, в неполярном окружении, и, следовательно, не титруются. *В* — три внутренних остатка находятся в полярном окружении и доступны растворителю.

Пример 14-Д. *Спектрофотометрическое титрование белков.* При многих исследованиях структуры белков возникает необходимость определения величины р*К* диссоциации протонов ионизуемых боковых групп аминокислот, поскольку эти величины указывают на локализацию аминокислоты в белке (правило *2* в табл. 14-2). Это часто можно сделать спектрофотометрически, так как при диссоциации зачастую меняется спектр одного из хромофоров (например, в случае тирозина); см. рис. 14-7. Рассмотрим гипотетический тирозинсодержащий белок и для определения числа внешних тирозиновых остатков воспользуемся правилом *2* (табл. 14-2). Предположим, что в этом белке имеется пять тирозиновых остатков. Если все они расположены на поверхности и ионизуются при увеличении pH, спектр, отвечающий остаткам тирозина, будет приближаться к спектру свободного тирозина при высоких значениях pH, изображенному на рис. 14-7 (правило *2б*). Другими словами, зависимость D_{295} ($\lambda_{\text{макс}}$ для ионизованной формы) от pH будет выглядеть, как кривая *А* на рис. 14-17. Когда же, наоборот, три тирозиновых остатка расположены внутри в неполярном окружении, полученная кривая аналогична кривой *Б* (правило *2а*); отношение величины первого плато к конечной величине равно $\sim ^2/_5$. Отметим, что при очень высоких pH на кривой видно большое возрастание D_{295}. Это указывает на то, что внутренние тирозиновые остатки стали доступны растворителю, т. е. белок развернулся (денатурировал).

Если бы три внутренних тирозиновых остатка были в полярном окружении, то получили бы кривую, похожую на кривую *B*, которая указывает, что эти три остатка имеют значение р*K*, отличное от такового для экспонированных групп (правило *2в*).

Пример 14-Е. *Определение некоторых особенностей конформации белков методом пертурбации растворителем и дифференциальной (разностной) спектроскопии.* Согласно правилу *1* табл. 14-2, спектры поглощения хромофоров зависят от полярности их окружения. Это можно использовать для определения: 1) расположения хромофоров внутри или снаружи белка и 2) полярности окружения какой-нибудь внутренней аминокислоты.

Остановимся на п. 2, так как в этом случае легче следовать ходу рассуждений. Некоторый белок помещают в полярный растворитель и получают спектр поглощения внутреннего хромофора. Его сравнивают с известными спектрами того же хромофора в полярном и неполярном растворителях. Если полученный спектр сходен со спектром хромофора в неполярном растворителе, то хромофор должен находиться в неполярной области белка, и наоборот; степень смещения $\lambda_{макс}$ позволяет оценить степень полярности.

Метод пертурбации растворителем позволяет определить в результате регистрации спектров поглощения белка в полярном и неполярном растворителях, является ли аминокислота внутренней или внешней. Поскольку обычно представляет интерес определение структуры белка в водных солевых растворах (моделирующих нахождение белка в живой клетке), необходимо, чтобы неполярный растворитель сам по себе не вызывал конформационных изменений, и это нужно всегда проверять другими методами. В действительности белки очень редко изучают в неполярных растворителях, так как большинство белков либо не растворяется, либо денатурирует в этих растворителях. В обычной практике используют растворитель, который на 80% состоит из воды, а на 20% — из вещества пониженной полярности. Некоторые стандартные смеси приведены в табл. 14-3. Эти растворители с пониженной полярностью называются *растворителями-пертурбантами.*

Наиболее удобным приемом, позволяющим применять метод пертурбации растворителем, является *дифференциальная спектроскопия,* потому что в этом случае нет необходимости определять спектр дважды, т. е. в присутствии и в отсутствие пертурбанта. Обычно в абсорбционной спектроскопии спектр получают путем измерения поглощения раствора и вычитания поглощения растворителя (или, как описано выше, путем настройки спектрофотометра на нуль по растворителю). В дифференциальной спектроскопии в двух кюветах для образца содержатся одинако-

ТАБЛИЦА 14.3

Растворители, обычно используемые в методе пертурбации растворителем

Добавляемая жидкость (20 объемов/100 объемов конечного раствора в H_2O)	
Диметилсульфоксид	Этиленгликоль
Диоксан	Глицерин
Этанол	
Добавляемое твердое вещество (20 г/100 г конечного раствора в H_2O)	
Арабит	Полиэтиленгликоль
Эритрит	Сахароза
Глюкоза	Мочевина
Маннит	

вые растворы, однако один из них содержит пертурбант. Вместо того чтобы измерять спектры обоих растворов, при каждой длине волны вычитается поглощение одного из поглощения другого раствора (конечно, необходимо, чтобы поглощение обоих растворителей было одинаковым при всех используемых длинах волн — именно так и происходит в случае растворителей, приведенных в табл. 14-3).

Дифференциальный спектр, отличный от нуля, будет появляться только в том случае, если на спектр образца оказывает влияние пертурбант. Параметры, получаемые из таких спектров,— $\lambda_{макс}$ и $\Delta\varepsilon$ при $\lambda_{макс}$. На рис. 14-18 показаны дифференциальные спектры триптофана и тирозина (аминокислот, которые наиболее часто изучаются методом пертурбации растворителем) в 20%-ном этиленгликоле.

Ниже следует пример анализа с помощью метода пертурбации растворителем, в котором используется дифференциальная спектроскопия; в качестве хромофора выступает триптофан. Рассмотрим гипотетический белок с пятью триптофановыми остатками. Как видно из рис. 14-18, на дифференциальном спектре

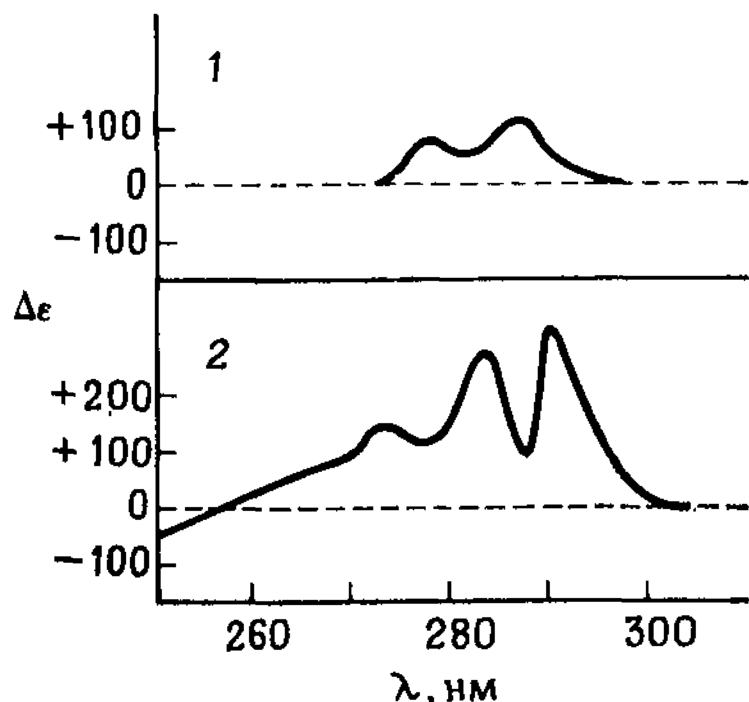


РИС. 14-18.

Дифференциальные спектры тирозина (*1*) и триптофана (*2*) в 20%-ном водном растворе этиленгликоля. Отметим, что на дифференциальных спектрах $\Delta\varepsilon$ могут иметь отрицательные значения.

раствора белка в воде относительно раствора белка в 20%-ном этиленгликоле, имеется пик при 292 нм. Количество триптофана в образце может быть определено из D_{280} и ε_{280}, измеренных в H_2O; а из $\Delta\varepsilon_{292}$ для свободного триптофана в воде и в 20%-ном этиленгликоле известна ожидаемая ΔD_{292} для образца при условии, что призошла пертурбация всех триптофановых остатков. Допустим, что эта величина равняется 1,00. Если же для этого белка измерить ΔD_{292}, то она будет составлять 0,6. Так как пертурбации подвергаются только те остатки, которые расположены на поверхности, то их число $0{,}6/1{,}00 \cdot 5 = 3$. Если известна аминокислотная последовательность белка, с помощью простого приема можно идентифицировать отдельные триптофановые остатки, которые находятся на поверхности. При обработке белка различными окислителями, индольная группа триптофана окисляется и перестает поглощать. Преимущественно будут окисляться только те триптофановые остатки, которые находятся на поверхности; но это необходимо проверять. Это тоже может быть сделано с помощью метода пертурбации растворителем и дифференциальной спектроскопии. Если $\Delta D_{292} = 0$ после окисления, окисленные триптофановые остатки должны быть на поверхности. Убедившись в этом, можно заново определить последовательность аминокислот в окисленном белке и отметить положение окисленных триптофановых остатков. Следовательно, могут быть идентифицированы отдельные триптофановые остатки, находящиеся на поверхности. Такого рода информация помогает при установлении пространственной структуры молекулы и часто служит отправной точкой для рентгеноструктурного анализа.

В предыдущем примере величина ΔD_{292}, которую можно было ожидать, если бы все триптофановые остатки находились на поверхности, была рассчитана из величин оптической плотности и молярного коэффициента погашения чистого белка в отсутствие пертурбанта. Такой расчет невозможен, если в образце белка содержатся поглощающие примеси. Однако измерение можно сделать другим путем, воспользовавшись тем, что, если белок денатурировал, все аминокислоты находятся в контакте с растворителем. Следовательно, максимальное значение ΔD_{292} можно определить из дифференциального спектра денатурированного белка в растворителе-пертурбанте против нативного белка в полярном растворителе.

До сих пор мы пытались отличить внешние аминокислоты от внутренних. Однако это различие не всегда отчетливо, поскольку в некоторых случаях хромофор не спрятан полностью, а находится в глубокой полости. При этом воздействовать на его спектр можно только в том случае, если молекулы пертурбанта меньше некоторого критического размера и могут попасть в по-

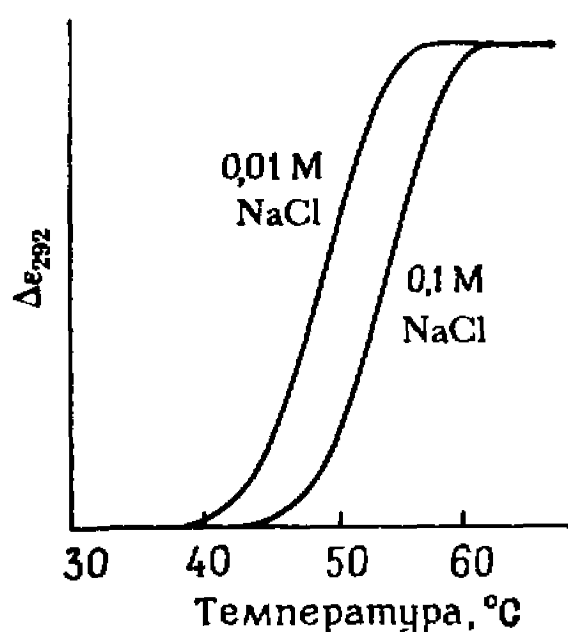


РИС. 14-19.

Изучение перехода спираль-клубок в гипотетическом белке методом пертурбационной дифференциальной спектроскопии в 20%-ном водном растворе этиленгликоля, содержащем NaCl в двух различных концентрациях.

Измерения ведутся при одной длине волны. Раствором сравнения для получения дифференциального спектра служит раствор белка в этиленгликоле, содержащем NaCl, при 20°C. Отметим, что этот белок более устойчив при бо́льших концентрациях NaCl, так как в 0,1 M NaCl он разворачивается при более высоких температурах.

лость. Этот факт также можно использовать для получения информации о конформации молекулы. Приведем список веществ, которые наиболее часто применяют с этой целью, а также их усредненные диаметры: D_2O (2,2 Å), диметилсульфоксид (4,0 Å), этиленгликоль (4,3 Å), глицерин (5,2 Å), арабит (6,4 Å), глюкоза (7,2 Å) и сахароза (9,4 Å).

Пример 14-Ж. *Переход спираль — клубок в белках (денатурация).* Так как в процессе денатурации спрятанный хромофор становится доступным растворителю, контролируя поглощение этих хромофоров, можно наблюдать переход спираль — клубок в белках так же, как путем исследования гиперхромии изучали денатурацию ДНК. Например, если в белке содержатся триптофановые остатки, часть из которых расположена внутри, то, измеряя $\Delta\varepsilon_{292}$, можно проследить, как в зависимости от температуры происходит разворачивание молекулы. Это можно, кроме того, использовать для изучения влияния на термическую устойчивость других факторов, таких, например, как концентрация NaCl. На рис. 14-19 показаны такого рода данные, полученные для гипотетического белка.

Пример 14-З. *Обнаружение связывания с белками малых молекул.* Связывание субстрата с активным центром фермента оказывает влияние на полярность этого района или на доступность его растворителю и часто вызывает изменение спектров хромофоров, находящихся в активном центре или недалеко от него. Сравнивая наблюдаемые изменения с изменениями, происходящими при пертурбации растворителем, можно получить информацию о структуре активного центра. Например, добавление различных субстратов к лизоциму приводит к сдвигу $\lambda_{макс}$ триптофана в область бо́льших длин волн. Величина изменения такая, какую можно было ожидать при перемещении одного триптофанового остатка из полярного окружения в неполярное. На основании этого можно предположить, что триптофан находится в месте связывания. Кроме того, изучение лизоцима мето-

дом пертурбации растворителем, как в примере 14-Е, показывает, что на поверхности белка находятся 4 триптофановых остатка (т. е. пертурбации может подвергаться некоторая часть из известного числа триптофановых остатков); если изучить фермент-субстратный комплекс, то выясняется, что только три триптофановых остатка находятся на поверхности. Следовательно, когда добавлен субстрат, один триптофан теряет контакт с растворителем. Это можно снова интерпретировать как доказательство присутствия триптофана в активном центре. Значение этого несложного оптического анализа состоит в том, что он осуществляется в растворе и, следовательно, подтверждает, что структура, определенная с помощью рентгеноструктурного анализа (на сухих образцах), а именно наличие в молекуле полости, в которой находится триптофан и происходит связывание субстрата, вероятно, сохраняется для лизоцима и в растворе.

Во многих случаях поглощение хромофоров фермента, субстрата или их обоих меняется в процессе комплексообразования. Следовательно, спектральный анализ (имеется в виду изучение $\Delta\varepsilon$ как функции концентрации субстрата или фермента) можно использовать для определения констант диссоциации. Это действительно очень полезный метод, применимый к исследованию связывания с белком любых веществ (например, небольших молекул или ионов металлов) во всех случаях, когда наблюдаются изменения в спектре.

Пример 14-И. *Ассоциация белка.* Изменения спектров в процессе ассоциации белка могут быть вызваны следующими причинами: либо хромофоры, находившиеся на поверхности, попали в участок связывания и стали недоступны растворителю, либо произошла конформационная перестройка, в результате которой хромофор стал недоступным или доступным, но в другой части молекулы. Следовательно, как в примере 14-З, по спектральным изменениям можно контролировать наличие взаимодействия молекул белка и посредством этого определять условия, кинетику этого процесса и т. д. (рис. 14-20).

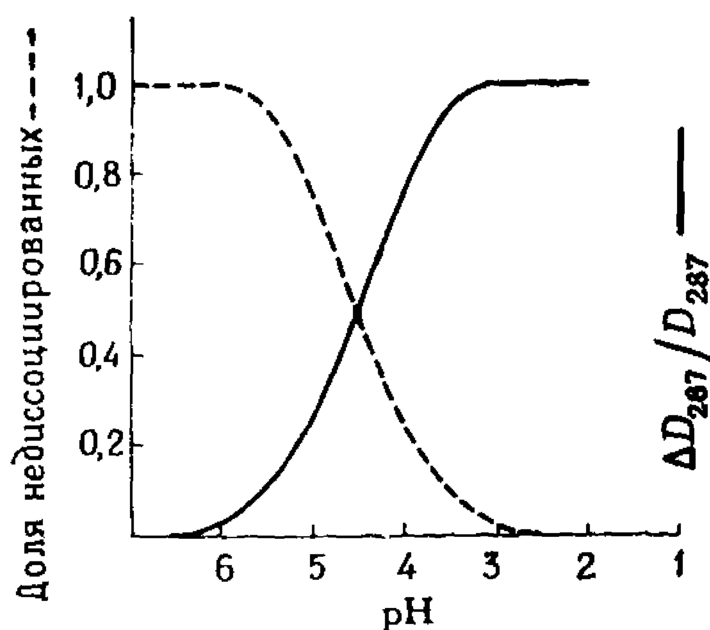


РИС. 14-20.

Обнаружение с помощью дифференциальной спектроскопии диссоциации овомакроглобулина на субъединицы, индуцируемой изменением pH; D_{287} при различных pH измеряли против D_{287} при pH 7.

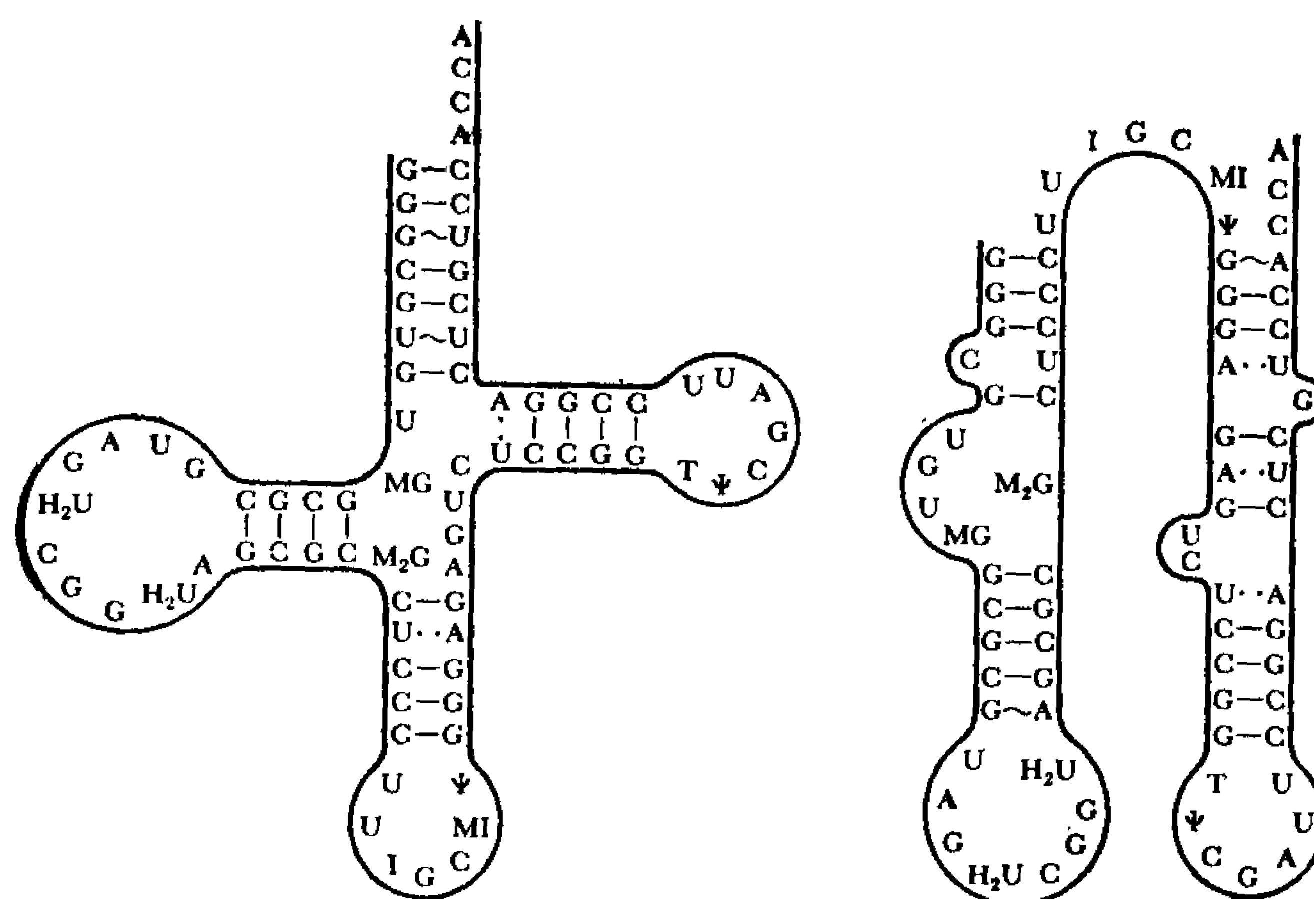


РИС. 14-21.

Две из нескольких возможных структур дрожжевой аланиновой тРНК, построенных таким образом, что большая часть оснований участвует в образовании водородных связей. Водородная связь пары G·C обозначена сплошной линией, пары A·U — точками, более слабые водородные связи, найденные для других пар оснований, обозначены волнообразной линией. Определение числа пар оснований различного типа по данным ЯМР показывает, что правильной является структура клеверного листа (слева).

Принятые обозначения: G — гуанозин; C — цитидин; A — аденозин; U — уридин; I — инозин; H_2U — дигидроуридин; T — рибозилтимин; MG — метилгуанозин; M_2G — диметилгуанозин; Ψ — псевдоуридин; MI — метилинозин. [Последовательность оснований описана *Holly R. W., Apgar J., Everett G. A., Madison J. T., Marquisee M., Merill S. H., Fenswick J. R, Zamer A.*, Sclonce, 147, 1462—1465 (1965).]

Этот процесс можно изучать с помощью дифференциальной спектроскопии; в этом случае для получения дифференциального спектра используют два раствора, которые идентичны во всем, кроме концентрации.

Пример 14-К. *Пертурбация растворителем нуклеиновых кислот.* Замена воды на 50%-ную D_2O приводит к характерным изменениям в спектрах мононуклеотидов, но не оказывает влияния на спектры пар оснований. Таким образом, изменения в спектре НК в 50%-ной D_2O можно использовать для определения доли оснований, которые не участвуют в образовании пар. Это особенно важно при изучении таких молекул, как транспортная РНК (тРНК). В тРНК последовательность оснований такова, что не все они образуют водородные связи; можно построить пространственные модели, в которых реализуется часть водородных связей (рис. 14-21). Согласно различным моделям, требуется, чтобы разное число оснований было связано водородными связями; спектральные данные позволяют исключить некоторые возмож-

ные модели (см. гл. 17, в которой обсуждается роль ядерного магнитного резонанса в выборе возможных моделей тРНК путем измерения числа пар оснований, образующих водородные связи).

„Репортерные" группы

В молекуле, представляющей интерес для исследователя, часто содержится много хромофоров, но ни один из них не находится в участке, ответственном за биологическую функцию молекулы, или рядом с ним. Эту ситуацию удается иногда исправить, вводя в нужный участок дополнительный хромофор. Такой хромофор называется *«репортерной» группой.* Для успешного использования «репортерная» группа должна иметь спектр, отличный от остальной части макромолекулы, она должна присоединяться только в одно положение, и ее введение не должно влиять на способность макромолекулы к различным видам взаимодействия. Удобными «репортерными» группами являются диметиламиноазобензол и арсаниловая кислота. Следующий пример иллюстрирует использование «репортерных» групп.

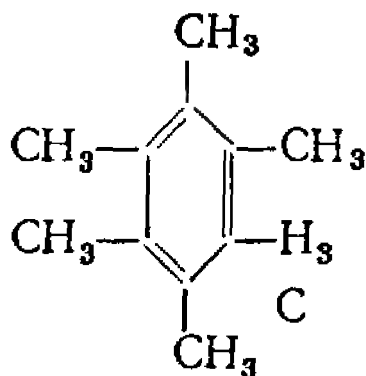
Пример 14-Л. *Конформация карбоксипептидазы А.* В активном центре фермента карбоксипептидазы А содержится тирозин, а в определенном положении вне активного центра — атом цинка. Путем диазотирования и последующего азосочетания можно присоединить арсаниловую кислоту к тирозину, находящемуся в активном центре. Спектр поглощения свободного арсанилазотирозина значительно изменяется при связывании цинка. Спектр модифицированного белка в растворе такой же, как спектр модельного цинкового комплекса. Значит, белок упакован таким образом, что место расположения цинка и активный центр находятся недалеко друг от друга. Это особенно интересный пример, так как при изучении кристаллов с помощью рентгеноструктурного анализа показано, что цинк не располагается вблизи активного центра. Однако спектр «репортерной» группы в кристалле белка также свидетельствует об отсутствии связывания цинка. Следовательно, структура белка в растворе не такая, как в кристаллах, используемых для рентгеноструктурного анализа.

Следует отметить, что эта методика сходна с методом флуоресцентных меток и проб (см. гл. 15).

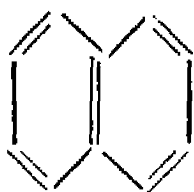
Поглощение поляризованного света

Плоскость поляризации электромагнитной волны определяется как плоскость вектора **E** (рис. 14-1, см. также гл. 16, где более полно описывается поляризация и возникновение плоскополяризованного света). Обычный луч света не поляризован, так как его можно представить как набор волн со случайно ориентированными плоскостями поляризации. Однако плоскополяризованный свет можно получить, либо пропуская свет через различные вещества, либо путем отражения от поверхности под критическим углом.

Все хромофоры имеют по крайней мере одну ось, вдоль которой преимущественно поглощается плоскополяризованный свет. Например, вероятность поглощения света гексаметилбензолом, представляющим собой симметричное плоское кольцо



максимальна, когда вектор **E** находится в плоскости кольца, и равна нулю, когда он перпендикулярен этой плоскости. Если в молекуле имеются оси симметрии различной длины, как в случае плоской молекулы нафталина



то поглощение происходит только тогда, когда вектор **E** лежит в плоскости кольца, но вероятность поглощения зависит от того, параллелен ли вектор **E** длинной или короткой оси молекулы. Этот эффект называется дихроизмом; он определяет различные значения величины ε для отдельных направлений. Его удобно использовать, определяя ориентацию молекул в биологических системах. Этот эффект описан детально в гл. 2 в разделе, посвященном поляризационной микроскопии. При исследованиях макромолекул он наиболее часто используется в инфракрасной спектроскопии для определения ориентации отдельных связей по отношению к оси молекулы. Это будет описано в следующем разделе.

Инфракрасная спектроскопия

В результате поглощения света в ИК-области (от 10^3 до 10^5 нм (рис. 14-3) происходят переходы между колебательными уровнями основного состояния молекулы. Колебательные уровни и, следовательно, ИК-спектры возникают за счет характеристических движений (растягивания связей, изменения величины углов между связями и более сложных типов движений) различных функциональных групп (например, метильной, карбонильной, амидной и т. д.). Ценность спектрального анализа в ИК-области обусловлена тем, что вид колебаний каждой группы очень чувствителен к изменениям химической структуры, конформации и окружения, и в этом смысле ИК-спектроскопия не отличается от спектроскопии в видимом и ультрафиолетовом свете. Этот метод рассматривают отдельно, главным образом ввиду некоторых отличий в методологии и ввиду того, что он может быть использован для изучения химических групп, которые нельзя исследовать с помощью абсорбционной спектроскопии в ультрафиолетовом и видимом свете.

Техника измерения ИК-спектров

Инфракрасные спектрофотометры в принципе не отличаются от спектрофотометров, работающих в ультрафиолетовом и видимом свете. Источником излучения является тело, нагреваемое до 1500—1800 К, для выделения длин волн используется монохроматор, но в качестве детектора применяется термопара (вместо фотоэлемента).

Главная трудность ИК-спектроскопии состоит в том, что нельзя использовать водные растворы из-за очень сильного поглощения воды в ИК-области (так как она имеет высокий коэффициент погашения и ее концентрация составляет 55 моль/л). Эту трудность можно частично обойти, используя D_2O или смеси H_2O—D_2O. Иногда также используют хлороформ, потому что в нем растворяются многие полярные молекулы, но хлороформ индуцирует конформационные изменения. Наиболее общим приемом, позволяющим изучать макромолекулы, является использование тонких, достаточно сухих пленок. Их готовят растворением вещества в летучем растворителе, затем раствор помещают на плоскую пластинку и дают возможность растворителю испариться; образовавшуюся пленку снимают с пластинки. Если необходимо приготовить пленки, в которых все молекулы ориентированы в одном и том же направлении, их растягивают. Такие пленки пригодны для работ в поляризованном свете, с помощью которого можно определять ориентацию отдельных групп по от-

ношению к оси молекулы. Конечно, всегда необходимо принимать во внимание, что структура макромолекулы в сухой пленке отличается от таковой в растворе.

Информация, содержащаяся в инфракрасных спектрах

Во-первых, необходимо отметить, что при изображении инфракрасных спектров традиционно используются волновые числа $1/\lambda$ или частоты ν, а не длины волн. В терминах частот каждая полоса в ИК-спектре может быть охарактеризована частотой максимума поглощения $\nu_{макс}$, шириной полосы на половине высоты $\Delta\nu_{1/2}$, оптической плотностью при $\nu_{макс}$ ($A_{макс}$) и формой полосы *. Для ориентированных пленок измеряется дихроичное отношение (R), т. е. отношение площадей полос, полученных, когда электрический вектор световой волны параллелен и перпендикулярен оси молекулы. В результате многочисленных исследований мономеров известной структуры теперь достоверно установлено, какой группе и какому типу колебаний соответствует каждая полоса в спектре. В случае простых соединений ИК-спектры отличаются от спектров в видимом и ультрафиолетовом свете тем, что они обычно состоят из довольно узких линий (рис. 14-22). Однако в случае макромолекул так велико число типов связей и так много различных конформаций, что каждая полоса смещается в той или иной степени в зависимости от

* Волновое число $1/\lambda=\nu/c$, где c — скорость света в вакууме. Единицы, в которых выражаются ν и $1/\lambda$, — это $с^{-1}$ и $см^{-1}$ соответственно.

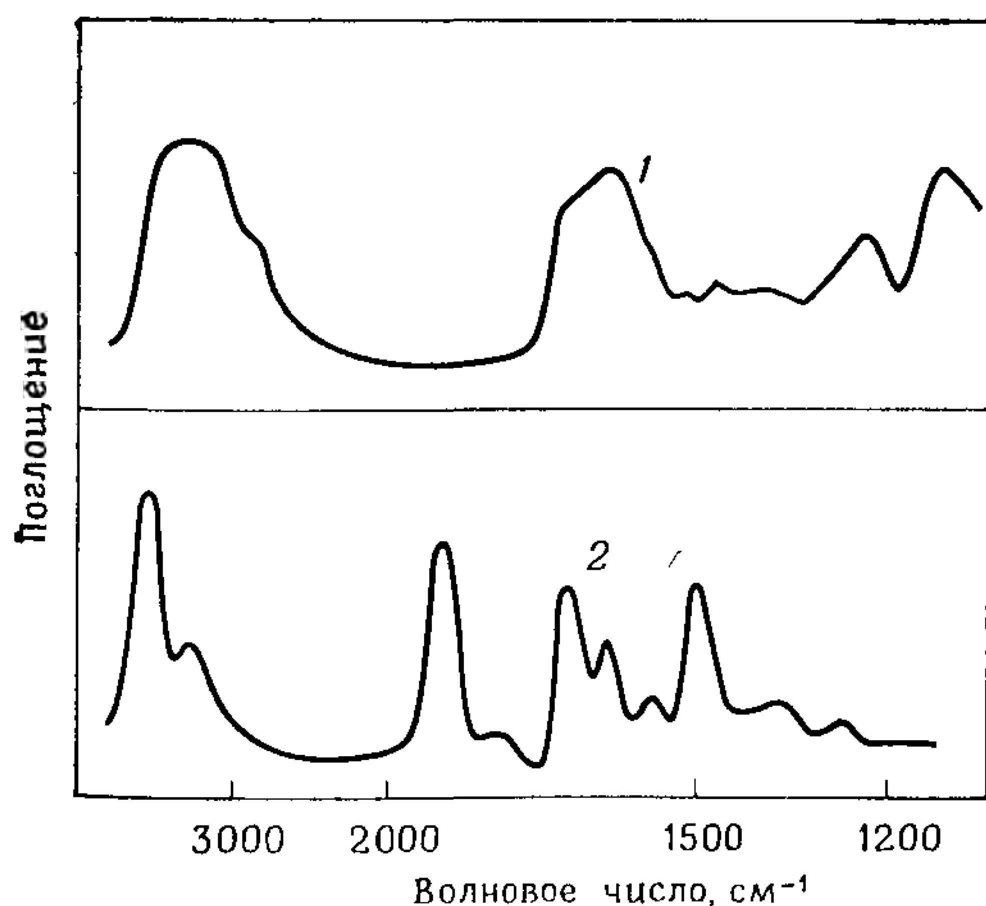


РИС. 14-22.

Инфракрасные спектры ДНК (*1*) и стеариновой кислоты (*2*). Отметим наличие широких полос в спектре ДНК.

положения соответствующей группы в молекуле, так что все полосы перекрываются и вследствие этого в спектре содержится несколько относительно широких полос (рис. 14-22).

Применение инфракрасной спектроскопии

Приведем краткое описание относительно распространенных областей применения ИК-спектроскопии.

Определение относительного содержания α-спирали, β-структуры и беспорядочного клубка в белках по интенсивностям различных амидных полос, например полосы амид I. Возможность этого обусловлена тем, что $1/\lambda_{макс}$ полосы амид I отличаются для α-спирали, β-структуры и беспорядочного клубка. Они составляют 1650 и 1658 $см^{-1}$ для α-спирали и беспорядочного клубка, соответственно и 1632 и 1685 $см^{-1}$ для β-структуры. Наибольшую чувствительность имеет ИК-спектр по отношению к β-форме.

Идентификация обменивающегося атома водорода. Частоты многих полос изменяются при замещении дейтерия на водород. Обычно известно, какой функциональной группе (карбонильной, окси-, аминогруппе) соответствует данная полоса; наблюдая за тем, какие полосы изменили свое местоположение в спектре, можно идентифицировать группы, в которых возможен обмен. Так как обычно атомы водорода некоторых функциональных групп (например, оксигруппы) обмениваются быстро, то замедленное изменение $\nu_{макс}$ в этих группах указывает на замедление обмена; это, как правило, означает, что группа труднодоступна.

Идентификация числа водородных связей и функциональных групп, участвующих в образовании водородных связей, и изучение разрыва водородных связей при денатурации. Это может быть сделано, например, путем растворения макромолекулы в D_2O, денатурации образца и наблюдения за тем, какие полосы, соответствующие дейтерированным группам, появляются в процессе денатурации.

Идентификация таутомерных форм по появлению новых полос. Предположим, что некоторая молекула содержит оксигруппу, но ее ИК-спектр указывает на присутствие карбонильной группы. Это является серьезным доказательством наличия таутомерии. Если эта молекула входит в состав макромолекулы, относительные интенсивности полос, соответствующих окси- и карбонильной группам, могут изменяться по сравнению со свободной молекулой — одна из полос может даже исчезнуть. Такого рода данные обычно указывают на химическую структуру мономерного звена в полимере. Это было особенно важно для понимания структуры нуклеотидов и влияния различных нуклеотидов на частоту мутаций.

Изучение взаимодействия между небольшими молекулами, такими, как рибофлавин и аденин, и связывание белка с лигандом. Эти процессы приводят, как и в случае абсорбционной спектроскопии в ультрафиолетовом свете, к характерным изменениям ν и интенсивности полос.

Определение отношения числа A·U-к числу G·C-пар в тРНК. Для двух типов пар оснований наблюдаются полосы при различных значениях ν. Это было использовано для того, чтобы сделать выбор между структурами, показанными на рис. 14-21.

Титрование карбоксильных групп белка. Некоторые «спрятанные» карбоксильные группы титруются при значениях pH, которые сильно отличаются от обычных значений для этих групп и лежат в области, где титруются другие группы, способные к ионизации (см. пример 14-Д, в котором описан аналогичный эксперимент, проведенный в УФ-свете). Наблюдать за ионизацией карбоксильных групп можно по спектральным изменениям в D_2O.

Использование поляризованного ИК-света для определения ориентации водородных связей в вытянутых пленках белков и полипептидов путем установления ориентации C=O- и NH-групп. Возможность таких измерений обусловлена тем, что эти группы поглощают сильнее всего тогда, когда они параллельны вектору **E**. Это можно использовать для обнаружения α-спирали, учитывая, что теоретическое отношение величины поглощения для случаев, когда вектор **E** параллелен и перпендикулярен оси белка («дихроичное отношение»), составляет 44 при 3300 $см^{-1}$ (валентное колебание NH—). Если измеряемое отношение близко к этой величине, велика вероятность α-спиральной структуры. Само теоретическое значение достигается редко, так как ориентация полипептидных цепей в пленке не может быть совершенной. Из измеряемых дихроичных отношений при 3300 и 1660 $см^{-1}$ (валентное колебание C=O) можно, кроме того, рассчитать величину максимального угла, который эти группы образуют с осью молекулы. Информация такого типа представляет собой большую ценность при интерпретации рентгенограмм.

Спектроскопия комбинационного рассеяния

Как правило, при рассеянии света его частота не меняется (так называемое упругое рассеяние); однако небольшая часть излучения, обычно в инфракрасной области, рассеивается неупруго с изменением частоты. Это называется рассеянием Рамана. Изменение частоты в процессе рассеяния отличается от изменения

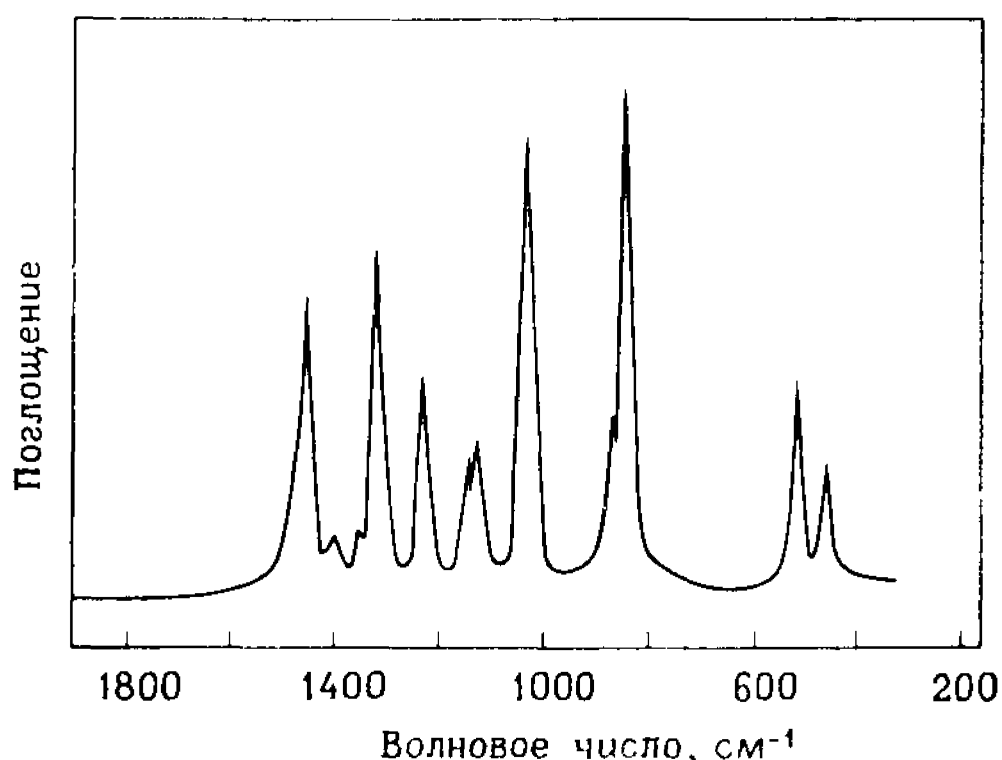


РИС. 14-23.
КР-спектр диоксана.

частоты, с которым мы встречаемся при флуоресценции (гл. 15), тем, что не происходит перехода на более высокий *электронный* уровень. Причиной изменения частоты является либо возбуждение на более высокий *колебательный уровень,* либо добавление к электромагнитной энергии световой волны колебательной энергии молекулы.

Если в процессе рассеяния свет возбуждает рассеивающий центр на более высоком колебательном уровне, энергия теряется и частота уменьшается. С другой стороны, если рассеивающий центр находится на более высоком колебательном уровне (например, за счет предварительных столкновений с молекулами растворителя), он может передавать свою колебательную энергию падающему свету и таким путем увеличивать его частоту. При обычно используемых температурах число молекул, обладающих запасом колебательной энергии, меньше, чем число молекул, не обладающих таковым, поэтому чаще частота уменьшается. Таким образом, спектроскопия комбинационного рассеяния, как и ИК-спектроскопия, изучает колебательные переходы. Ранее, ввиду отсутствия источников света высокой интенсивности и очень низкой интенсивности рассеянного света, метод КР-спектроскопии применялся относительно редко. К тому же изменения частот так малы, что требуется свет с высокой степенью монохроматичности. Обе эти проблемы были недавно решены путем использования в современных приборах лазеров. Это важный шаг вперед, так как КР-спектроскопия имеет то важное преимущество перед ИК-спектроскопией, что можно работать в растворах H_2O. На рис. 14-23 показан типичный КР-спектр.

КР-спектроскопия пока не имеет широкого распространения. Рассмотрим несколько возможных применений этого метода, описанных в литературе.

Доказательство цвиттер-ионного строения различных аминокислот. Ионизация амино- и карбоксильной групп сопровождается характерными изменениями в спектрах.

Распознавание аденозинмоно-, ди- и трифосфата и их ионизованных форм в растворе. Метод используется для изучения некоторых ферментативных реакций, потому что по КР-спектру реакционной смеси можно определить относительные количества молекул каждого типа в процессе реакции или в равновесии.

Определение содержания в полиаминокислотах: α-спирали, β-структуры и беспорядочного клубка. Как и в случае ИК-спектроскопии, наблюдаются характерные амидные полосы, интенсивность которых пропорциональна относительному содержанию структуры каждого типа.

Определение числа S—S-связей в белках. S—S- и S—H-связи дают характерные $\nu_{макс}$.

Определение числа спаренных и неспаренных оснований в РНК. Каждое основание можно отличить по его КР-спектру, так что по относительной интенсивности пиков, соответствующих каждому основанию, можно определить состав оснований. Кроме того спектры меняются при дейтерировании, поэтому удается идентифицировать места медленного и быстрого обмена дейтерия на водород. Считают, что основание, для которого наблюдается медленный обмен, находится в составе пары, поскольку водородные связи препятствуют обмену (см. пример 14-К).

Список литературы

Beaven G. H., Johnson E. A., Willis H. A., Miller R. G. J., Molecular Spectroscopy, Heywood, 1961.

Brewer J. M., Pesce A. J., Ashworth R. B., Experimental Techniques: in Biochemistry, Prentice-Hall, 1974, ch. 7.

Donovan J. W. Ultraviolet Difference Spectroscopy: New Techniques and Applications and Spectrophotometric Titration of the Functional Groups of Proteins, in "Methods in Enzymology", vol. 27, edited by C. H. W. Hirs and S. N. Timasheff, Academic Press, 1973, pp. 497—525; 525—548.

Edisbury J. R., Practical Hints of Absorption Spectrometry, Helger-Watts, 1965.

Herskovitz J. T., Difference Spectroscopy, in "Methods in Enzymology", vol. 11, edited by C. H. Hirs, Academic Press, 1967, pp. 748—775.

Horton H. R., Koshland D. E., Environmentaly Sensitive Groups Attached to Proteins in "Methods in Enzymology", vol. 11, edited by C. H. W. Hirs, Academic Press, 1967, pp. 856—870. Описание использования репортерных групп.

Timasheff S. N., Some Physical Probes of Enzyme Structure in Solutions, in "The Enzymes", vol. 2, edited by P. D. Boyer, Academic Press, 1970, pp. 371—443.

Задачи

14-1. Поглощение раствора, содержащего вещество с молекулярным весом 423 в концентрации 32 мкг/мл, составляет 0,27 при 540 нм в односантиметровой кювете. Чему равен коэффициент молярного погашения при 540 нм? Допустить, что закон Бера соблюдается.

14-2. Раствор соединения А имеет $D_{260}=0{,}45$ и $D_{450}=0{,}03$. Раствор второго соединения Б имеет $D_{260}=0{,}004$ и $D_{450}=0{,}81$. 2 мл раствора А смешали с 1 мл раствора Б. Результирующая оптическая плотность смеси $D_{260}=0{,}3$ и $D_{450}=0{,}46$. Имеется ли взаимодействие между А и Б? Объяснить. Какое допущение делается, чтобы подтвердить это заключение?

14-3. Допустим, что только что приготовлены два образца: один — нативной ДНК и другой — денатурированной ДНК — и каждый диализован против 0,01 M NaCl. Затем добавляют к каждому раствору очень маленькое количество фермента и снимают этикетки с образцов. Как путем измерения поглощения можно установить природу каждого образца? Можно принять, что в опыте расходуется небольшая часть каждого образца и что фермент не мешает опыту. Придумайте другой опыт, в котором не требуется введения денатурирующего агента или создания условий, вызывающих денатурацию.

14-4. Предположим, что вы захотели узнать, сколько цитохрома *c* содержится в одной клетке *E. coli*. Известен молярный коэффициент погашения в максимуме поглощения. Как вы проделаете это измерение?

14-5. Молярный коэффициент погашения данного соединения 348 при 482 нм. Раствор этого соединения имеет $D_{482}=1{,}6$. При разбавлении 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4, 1 : 5 и 1 : 6 величины D_{482} составляют 1,52, 1,42, 1,05, 0,84, 0,70 и 0,61 соответственно. Какова молярность исходного раствора?

14-6. Молярные коэффициенты погашения вещества А при 260 и 280 нм равны соответственно 5248 и 3150. Для выделения А используется реагент Б, имеющий молярные коэффициенты погашения 311 и 350 при 260 и 280 нм. После выделения А $D_{260}=2{,}50$ и $D_{280}=2{,}00$. Какова концентрация А?

14-7. D_{260} денатурированной ДНК [измеренная при той температуре, когда достигается максимальная D_{260} (см. рис. 14-13)] постоянно на 37% выше, чем D нативной ДНК, например, при 20°C. Однако в 6 M растворе трифторацетата натрия D_{260} образца ДНК только на 16% выше, чем при 20°C. Предложите объяснение этого.

14-8. Белок помещают в 20%-ный раствор этиленгликоля и снимают его дифференциальный спектр против раствора, не содержащего этиленгликоля. При всех длинах волн $\Delta\varepsilon=0$. Что вы можете заключить о структуре белка?

Второй белок изучают в 20%-ном диметилсульфоксиде и 20%-ной сахарозе. В сахарозе $\Delta\varepsilon=0$. В диметилсульфоксиде проявляется характерный дифференциальный спектр триптофана. Наблюдаемая величина $\Delta\varepsilon$ удваивается, если белок нагревают в диметилсульфоксиде до 60°C. В 20%-ной сахарозе после нагревания до 60°C величина $\Delta\varepsilon$ эквивалентна $\Delta\varepsilon$ для 8 триптофановых остатков. Что вы можете сказать об этом белке?

14-9. В процессе титрования белка при 295 нм найдено, что ε_{295} резко возрастает при pH 9,6. При pH 11,7 ε_{295} возрастает снова, причем это увеличение составляет одну треть от первого. Если затем pH понизить до 6 и далее постепенно увеличивать, кривая зависимости ε_{295} от pH почти идентична кривой белка до титрования, за исключением того, что увеличение ε_{295} составляет только две трети от наблюдаемого вначале. Известно, что в белке имеется восемь тирозиновых остатков. Что вы можете сказать о структуре белка?

14-10. ДНК выделена из *E. coli*. Среднее содержание G·C-пар в ДНК *E. coli* 50%. ДНК растворили в смеси 0,15 M NaCl и 0,015 M цитрата Na. Получили кривую плавления. Вместо плавной кривой наблюдается двухступенчатая, с $T_{пл}$ 80 и 88°C. Первая ступень составляет 20% всего возрастания. Какое объяснение можно дать этому явлению?

ДНК из другой бактерии выделена тем же способом, но случайно нагрета до 75°C в течение 1 мин. Позднее ее использовали в эксперименте по плавлению. Кривая плавления была неожиданной в том смысле, что, хотя главный переход был между 82 и 88°C, имелось постепенное возрастание D_{260} на 10% в температурном интервале от 32 до 55°C. Объясните полученные данные.

ГЛАВА 15

Флуоресцентная спектроскопия

Как было показано в предыдущей главе, спектры поглощения позволяют получать различного рода информацию о свойствах макромолекул и их взаимодействиях с другими молекулами. Возможность получения такой информации основана на том, что спектр поглощения молекулы, содержащей хромофор, в значительной степени зависит от ее химического и внешнего окружения. В этой главе будет рассмотрен более чувствительный спектроскопический метод — флуоресценция.

В случае некоторых молекул поглощение фотона сопровождается испусканием света с большей длиной волны (т. е. меньшей энергией). Испускание света называется флуоресценцией (или фосфоресценцией, если свечение долгоживущее). Спектры флуоресценции еще в большей степени, чем спектры поглощения, зависят от окружения. Для надежной регистрации параметров флуоресценции требуются меньшие количества вещества. В связи с этим использование флуоресцентной спектроскопии часто дает определенные преимущества по сравнению с измерением поглощения (хотя техника получения абсорбционных спектров более проста). Путем измерения флуоресценции можно получить сведения о конформации, местах связывания, взаимодействиях с растворителем, степени гибкости, межмолекулярных расстояниях и коэффициентах вращательной диффузии макромолекул. К тому же флуоресценцию можно использовать для локализации в живых клетках тех веществ, которые невозможно обнаружить другими методами.

Теория флуоресценции, как и других физических методов, пока еще не всегда позволяет провести однозначную корреляцию между флуоресцентными характеристиками и свойствами непосредственного окружения излучателя; следовательно, и на этот раз возможность применения метода определяют эмпирические правила, полученные путем исследования модельных соединений.

Общая теория флуоресценции

Как было показано в гл. 14, молекула может иметь только дискретные величины энергии. Уровни потенциальной энергии молекулы описываются схемой энергетических уровней (рис. 15-1). На рисунке показаны два электронных уровня: нижний, или ос-

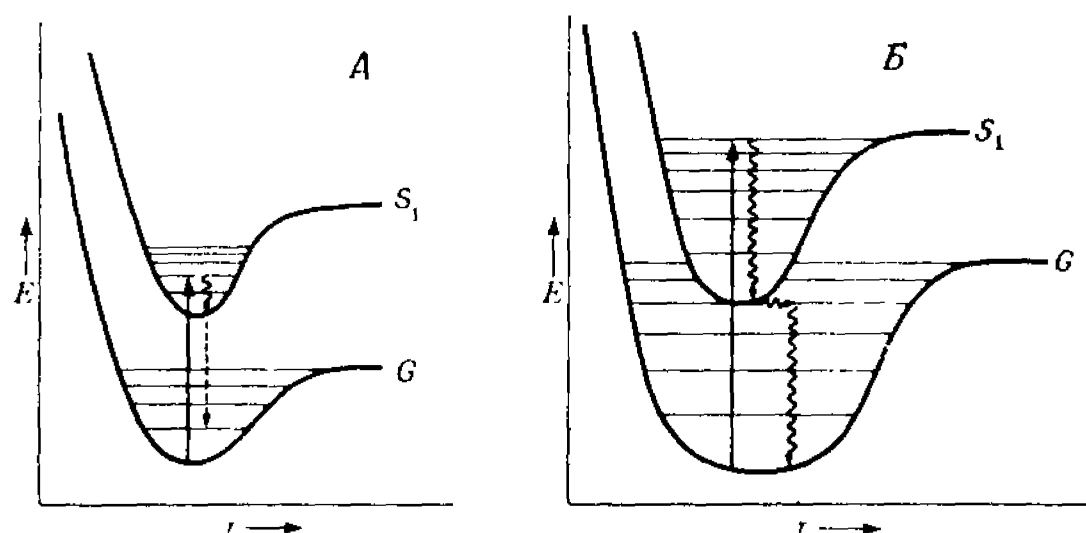


РИС. 15-1.

Схема энергетических уровней двух хромофоров; G и S_1 обозначают основное и первое возбужденное состояние соответственно (жирные линии). Колебательные уровни изображены тонкими линиями.

А — молекула способна флуоресцировать в результате перехода в возбужденное состояние (сплошная стрелка), указанного на схеме. После возбуждения происходит переход на самый нижний уровень возбужденного состояния с потерей колебательной энергии (волнистая стрелка) и затем испускание из этого состояния (пунктирная стрелка). *Б* — молекула не флуоресцирует, так как колебательные уровни G выше, чем самый нижний уровень S_1; следовательно, в этом случае может быть безызлучательный переход (горизонтальная волнистая стрелка) с S_1 на колебательный уровень G, а затем сопровождающийся потерей энергии безызлучательный переход на самый нижний уровень G (вертикальная волнистая стрелка).

новное состояние G, и один верхний, или первое возбужденное состояние S_1, и набор колебательных уровней каждого электронного уровня (см. гл. 14, где обсуждаются колебательные уровни). Как объяснялось в гл. 14, энергия света поглощается только в том случае, когда молекула переходит с нижнего на верхний энергетический уровень *. Такие переходы обозначены на схеме энергетических уровней вертикальными линиями. Если молекула вначале не возбуждена (т. е. находится на самом нижнем энергетическом уровне или в основном состоянии G) и затем поглощает энергию, которая больше, чем энергия, необходимая для того, чтобы достичь первого возбужденного электронного состояния S_1, избыток энергии может возбудить колебания молекулярного остова и молекула будет находиться на одном из колебательных уровней, показанных на рисунке. Эта колебательная энергия быстро рассеивается в виде тепла путем соударения с молекулами растворителя (если возбужденная молекула находится в растворе), и молекула опускается на самый нижний колебательный уровень S_1. Возбужденная молекула далее возвращается на уровень G, либо излучая свет (флуоресценция), либо путем безызлучательного перехода (описанного при обсуждении квантового выхода). Так как при переходе на самый нижний уро-

* Не все переходы возможны. Разрешенные переходы определяются правилами отбора квантовой механики.

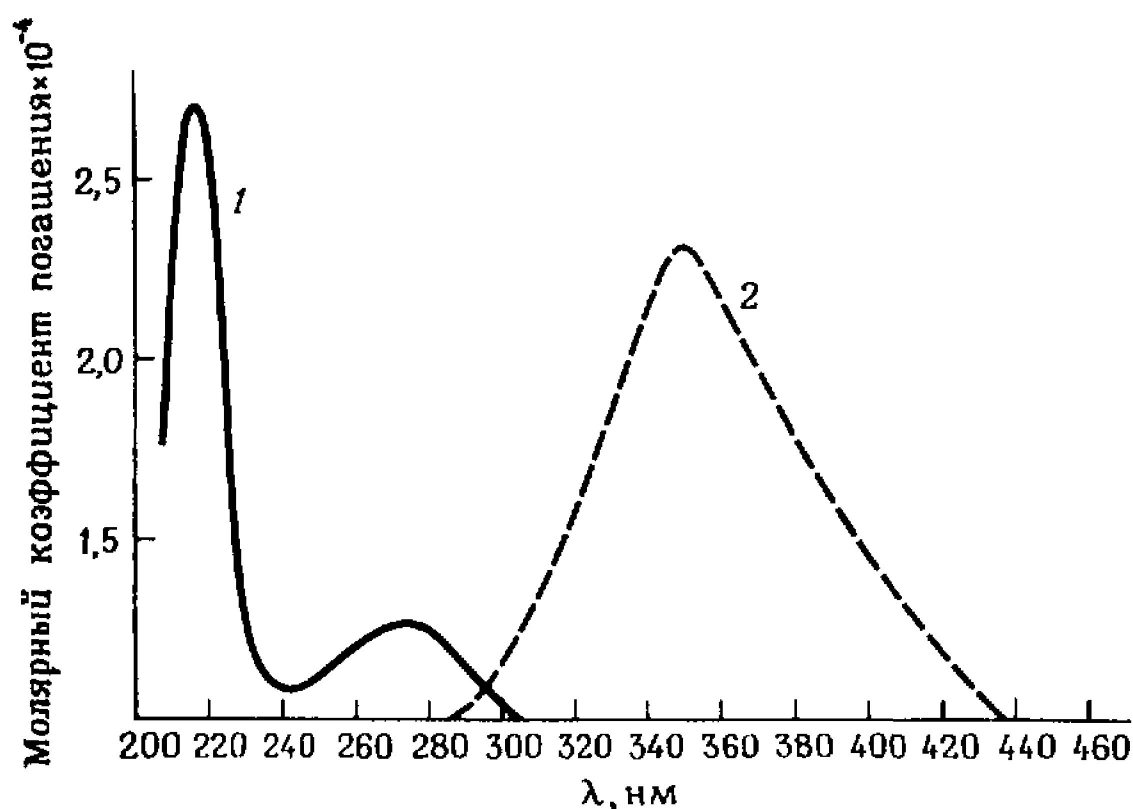


РИС. 15-2.

Спектры поглощения и флуоресценции триптофана.

1 — зависимость молярного коэффициента погашения от длины волны; 2 — спектр испускания в произвольных единицах.

вень S_1 энергия теряется, испускаемый свет имеет меньшую энергию (т. е. бо́льшую длину волны), чем поглощенный свет. Следовательно, длина волны испускаемого света больше, чем возбуждающего. Однако, возвращаясь на уровень G, молекула вместо «абсолютного» основного состояния может попасть на один из колебательных уровней G; эта колебательная энергия будет также рассеиваться в виде тепла. Следовательно, если имеется много соответствующих подуровней, испускаемый свет будет иметь различные длины волн (как правило, все они больше, чем длина волны поглощенного света); форма спектра флуоресценции определяется набором (густотой) всех переходов с нижнего колебательного уровня первого возбужденного состояния на каждый колебательный уровень основного состояния. Типичные спектры поглощения и флуоресценции показаны на рис. 15-2.

Как было сообщено ранее, возбужденная молекула не всегда флуоресцирует. Эффективность флуоресценции описывается *квантовым выходом* Q, а именно отношением числа излученных к числу поглощенных фотонов. (Фотон представляет собой порцию света, имеющую энергию $E=h\nu$, где h — постоянная Планка и ν — частота световой волны.) Q определяется несколькими факторами; одни из них связаны со свойствами самой молекулы (внутренние факторы), другие — со свойствами окружения. Внутренние факторы определяются распределением колебательных уровней состояний G и S. Например, если колебательный уровень V_G основного состояния имеет ту же самую энергию, что и колебательный уровень более низкого порядка V_S первого возбужден-

ного состояния, может иметь место безызлучательный переход (здесь не обсуждается) с V_S на V_G (рис. 15-1, *Б*), который сопровождается превращением энергии V_G в тепло. Именно так обычно и происходит с гибкими молекулами, потому что для них характерны очень высокие колебательные уровни в G (см. рис. 15-1, *Б*). На самом деле это наиболее общий путь рассеяния энергии возбуждения; им объясняется тот факт, что флуоресцирующие молекулы (флуорофоры *) редки и что те, которые флуоресцируют, почти всегда являются довольно жесткими ароматическими кольцами или системами колец.

Внутренние факторы обычно не представляют интереса для биохимиков, занимающихся изучением свойств макромолекул; факторы окружения имеют более важное значение. Действие этих факторов проявляется в первую очередь в появлении безызлучательных переходов, которые конкурируют с флуоресценцией и вследствие этого понижают величину Q; это понижение Q называется *тушением*. В биологических системах тушение обычно является либо результатом столкновений (химическая реакция или просто столкновение с обменом энергии), либо результатом безызлучательного дальнего переноса энергии, называемого *резонансным переносом энергии* (он будет обсуждаться далее в тексте). В экспериментальных условиях (в растворах) эти три фактора обычно проявляются как эффект растворителя или растворенных соединений (называемых *тушителями*), температуры, pH, соседних химических групп или концентрации флуоресцирующих молекул. В последующих разделах будет обсуждаться, как можно использовать сведения о влиянии окружения на хромофор для изучения макромолекул.

Аппаратура для измерения флуоресценции

На рис. 15-3 показана стандартная схема для измерения флуоресценции. Пучок света высокой интенсивности проходит через монохроматор для выделения требуемой длины волны возбуждения (флуоресцирующая молекула эффективно поглощает свет этой длины волны). Возбуждающий свет далее проходит через кювету с образцом. Чтобы исключить влияние падающего света, воспользовались тем фактом, что флуоресценция испускается во всех направлениях, так что ее можно наблюдать, например, под

* Далее в тексте вместо термина «флуорофор» будут использоваться более принятые в отечественной литературе термины: «флуоресцирующий хромофор» или «флуоресцирующая молекула». — *Прим. перев.*

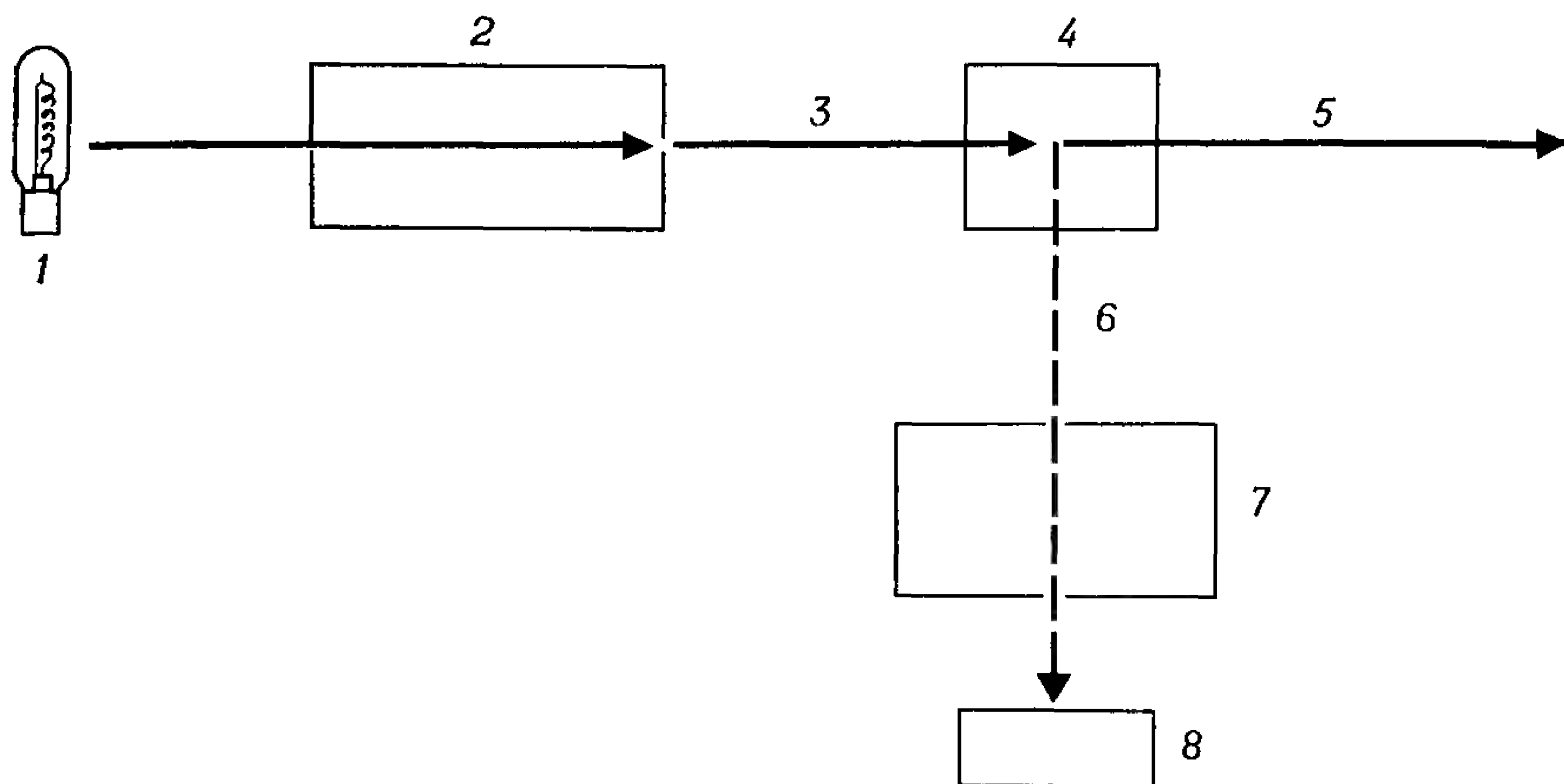


РИС. 15-3.

Схема устройства спектрофлуориметра.

Образец испускает флуоресценцию во всех направлениях, но в большинстве систем регистрируется только излучение, наблюдаемое под углом 90° к направлению возбуждающего света. Отметим, что этот прибор отличается от спектрофотометра только тем, что в случае спектрофотометра регистрировался бы свет, прошедший через образец. Современные автоматические спектрофлуориметры снабжены самописцами, на которых вычерчивается либо зависимость выходного сигнала детектора от длины волны испускаемого света, либо зависимость выходного сигнала детектора при одной или нескольких длинах волн от длины волны возбуждающего света.

1 — источник света; *2* — монохроматор возбуждения; *3* — возбуждающий свет; *4* — держатель кюветы с образцом; *5* — прошедший свет; *6* — испускаемый свет; *7* — монохроматор испускания; *8* — детектор.

прямым углом к падающему лучу. Испускаемый свет затем проходит через второй монохроматор для анализа длин волн и в конце концов падает на светочувствительный детектор (обычно фотоэлектронный умножитель). Многие современные приборы имеют сканирующие системы и самописцы, с помощью которых автоматически изменяются длины волн и строится зависимость интенсивности излучаемого света от его длины волны.

Интенсивность света есть мера энергии E, приходящейся на единицу площади за единицу времени. Поскольку чувствительность обычных детекторов света (например, фотоумножителей) зависит от длины волны и поскольку $E=hc/\lambda$, отношение выходных сигналов (электрического тока) фотоумножителя, когда на него падает излучение с двумя различными длинами волн, не такое, как отношение интенсивностей. Однако в большинстве экспериментов достаточно простого измерения выходного сигнала фотоумножителя, потому что при каждой длине волны обычно измеряются только относительные интенсивности — например, измеряется флуоресценция в присутствии и в отсутствие некоторого агента, при условии что данный агент не влияет на эффективность поглощения возбуждающего света. Тем не менее в не-

которых экспериментах необходимо измерить Q или определить распределение энергии по спектру флуоресценции; обе эти задачи требуют измерения абсолютной интенсивности. В обычных методах измерения интенсивности флуоресценции требуется калибровка фотоумножителя с помощью *термоэлемента* — прибора, способность которого измерять энергию падающего света не зависит от длины волны. Эту калибровку проводят с помощью некоторых промышленных спектрофлуориметров или используют прибор, называемый счетчиком квантов.

Важно знать, что при представлении спектров флуоресценции в журнальных статьях не часто делаются различия между исправленным и неисправленным спектром. Обычно вычерчивают спектр в виде зависимости выходного сигнала фотоумножителя от длины волны. Это *неисправленный* спектр. Нанесение на график интенсивности флуоресценции или квантового выхода дает *исправленный* спектр. Если на графике отложена величина выходного сигнала фотоумножителя, то называть ее флуоресценцией или интенсивностью флуоресценции неправильно. Вероятно, если не оговорено, как получен данный спектр, надежнее допустить, что он является неисправленным.

Для измерения Q требуется подсчет фотонов, так как

$$Q = \frac{\text{излученные фотоны}}{\text{поглощенные фотоны}} . \qquad (1)$$

Отметим, что Q — безразмерная величина. Так как энергия E одного фотона определяется уравнением $E = h\nu$, для измерения числа фотонов требуется измерить величину энергии светового потока и разделить ее на величину $h\nu$. Измерение абсолютного квантового выхода — трудный и утомительный процесс, в биохимических целях его проводят крайне редко. (Методики измерений даны в избранной литературе, приведенной в конце этой главы.) При обычном методе измерения Q требуется провести сравнение с флуоресцирующим веществом, Q которого известно; готовят два раствора: один — образца, другой — стандартного флуоресцирующего вещества — и измеряют интегральную флуоресценцию (т. е. площадь, ограниченную спектром) каждого, используя один и тот же источник возбуждения.

Квантовый выход Q_X образца X равен

$$Q_X = \frac{I_X Q_S A_S}{I_S A_X} , \qquad (2)$$

где Q_S — квантовый выход стандартного вещества, I_X и I_S — интенсивности флуоресценции образца и стандартного вещества

соответственно и A_X и A_S — поглощение (оптическая плотность) каждого раствора при длине волны возбуждения. Обычно растворы подбирают таким образом, чтобы $A_X = A_S$.

И еще раз необходимо напомнить о традициях представления данных. Очень часто опубликованные спектры изображаются в виде зависимости Q от λ, а также интенсивности флуоресценции при определенной длине волны выдаются за величину Q. На самом деле редко когда измеряется Q. Эта непоследовательность возникает из-за того, что так как при биохимических исследованиях обычно измеряют относительные интенсивности при двух различных условиях (например, в условиях, когда есть тушение или нет его) и, следовательно, используют данные двух спектров, соотношение относительных величин Q такое же, как интенсивностей флуоресценции.

Изучение белков путем измерения их собственной флуоресценции

При флуоресцентном анализе макромолекул используются два типа флуоресцирующих хромофоров: собственные флуоресцирующие хромофоры (содержащиеся в самих макромолекулах) и внесенные флуоресцирующие хромофоры (добавленные в систему и обычно связывающиеся с одним из компонентов). Вначале рассмотрим собственную флуоресценцию.

Белки содержат только три собственных флуоресцирующих хромофора — остатки триптофана, тирозина и фенилаланина (перечислены в порядке убывания Q). Флуоресценцию каждого из них можно отличить по соответствующей длине волны, при которой она возбуждается и при которой она наблюдается. На практике больше всего изучают флуоресценцию триптофана, потому что фенилаланин имеет очень низкий Q, а флуоресценция тирозина часто очень слаба из-за тушения. Флуоресценция тирозина почти полностью потушена, если он ионизован или расположен недалеко от аминогруппы, карбоксильной группы или триптофана. В особых ситуациях, однако, ее можно обнаружить, проводя возбуждение при 280 нм.

Основная цель изучения собственной флуоресценции белков — получение информации об их конформации. Возможность этого обусловлена тем, что как флуоресценция триптофана, так и флуоресценция тирозина существенно зависят от окружения (т. е. растворителя, pH, присутствия тушителя, малой молекулы или соседних групп в белке).

В основе использования измерений собственной флуоресценции белков лежат эмпирические «правила», полученные при изучении модельных соединений с хорошо известной структурой и конформацией. Обычно применяемые правила представлены в табл. 15.1. Следующие примеры иллюстрируют, как некоторые из этих правил используются на практике.

ТАБЛИЦА 15-1

Эмпирические правила для интерпретации спектров белков

1. Вся флуоресценция белка обусловлена наличием остатков триптофана, тирозина и фенилаланина, если известно, что белок не содержит особых флуоресцирующих компонентов

2. При уменьшении полярности растворителя $\lambda_{макс}$ в спектре флуоресценции триптофана смещается в область более коротких длин волн и интенсивность при $\lambda_{макс}$ возрастает:

а. Если $\lambda_{макс}$ смещена в область более коротких длин волн, когда белок находится в полярном растворителе, триптофан должен находиться внутри молекулы в неполярном окружении[a].

б. Если $\lambda_{макс}$ смещена в область более коротких длин волн, когда белок находится в неполярной среде, то либо триптофан расположен на поверхности белка, либо он попадает на поверхность в результате конформационного перехода, индуцированного растворителем[a]

3. Если вещество, известное как тушитель (т. е. оно тушит флуоресценцию *свободной* аминокислоты), например иодид, нитрат или ионы цезия, тушит флуоресценцию триптофана или тирозина, то эти аминокислоты должны быть на поверхности белка. Если тушения не происходит, этому имеется несколько причин:

а. Аминокислота находится внутри молекулы.

б. Аминокислота находится в полости, размеры которой слишком малы, чтобы туда вошел тушитель.

в. Аминокислота находится в сильно заряженном участке, и заряд может отталкивать тушитель. Например, иодиду (отрицательно заряженному тушителю) не удается потушить флуоресценцию триптофана, если триптофан находится в отрицательно заряженном участке; ион Cs^+ неэффективен, если флуоресцирующий хромофор находится в положительно заряженном участке. Нейтральный тушитель, акриламид, безразличен к наличию заряда

4. Если вещество, которое не влияет на квантовый выход свободной аминокислоты, действует на флуоресценцию белка, то оно делает это путем конформационной перестройки белка

5. Если триптофан или тирозин находятся в полярном окружении, характерные для них величины Q понижаются при возрастании температуры T, тогда как в неполярном окружении изменения величин Q незначительны. Следовательно, отклонение от монотонного уменьшения Q с увеличением T указывает на то, что нагревание индуцирует конформационную перестройку, потому что полярность областей, где остатки триптофана были доступны, должна измениться. Параллельное возрастание величин T *и* Q в условиях, когда белок находится в полярном растворителе, таком, как вода, указывает на то, что больше молекул триптофана стало доступно растворителю, и, следовательно, белок разворачивается

6. Q как триптофана, так и тирозина понижается, если α-карбоксильная группа этих аминокислот протонирована

7. Флуоресценция триптофана тушится соседними протонодонорными группами. Следовательно, если рK, измеренный путем контроля флуоресценции

триптофана, такой же, как рK известной, способной к ионизации группы (например, имидазола гистидина), то эта группа должна находиться очень близко от триптофана. Это правило применяется только в том случае, если можно независимо показать, что изменение pH не вызывает конформационных перестроек

8. Если при связывании какой-либо молекулы с белком тушится флуоресценция триптофана, то либо в результате связывания имеет место большая конформационная перестройка, либо часть триптофановых остатков находится в месте связывания или очень близко от него. Кроме того, понижение полярности растворителя приводит к смещению $\lambda_{макс}$ в область более коротких длин волн, и, следовательно, наличие такого смещения при связывании указывает на то, что вода исключается из комплекса

9. Если спектр поглощения малой молекулы перекрывает спектр испускания триптофана и расстояние между хромофорами невелико, имеет место тушение. Следовательно, если связывание такой молекулы с белком приводит к тушению флуоресценции триптофана, триптофан должен быть в месте связывания или недалеко от него

Примечание. При пользовании этими правилами необходимо иметь в виду два важных момента: 1) флуоресценция настолько чувствительна к факторам окружения, что необходимо всегда иметь в виду другую интерпретацию фактического материала, приведенного в этих правилах; 2) если в белке содержится несколько триптофановых остатков, как обычно и бывает, их квантовые выходы могут различаться. Следовательно, нельзя использовать абсолютную величину изменений флуоресценции для определения доли триптофановых остатков, находящихся в данном окружении, — например, отношения числа внутренних к числу внешних.

[a] Согласно стандартной терминологии, смещение $\lambda_{макс}$ в макромолекуле измеряется относительно $\lambda_{макс}$ свободной аминокислоты в воде.

Информация о конформации и участках связывания в белках, полученная путем изучения собственной флуоресценции белков

В следующих примерах показано, как, проводя простые измерения флуоресценции, можно делать довольно серьезные заключения о структурных особенностях белков. Необходимо отметить, что во многих случаях можно ограничиться измерением относительной флуоресценции. (Выражение «свободная аминокислота» всегда означает, что аминокислота растворена в воде.)

Пример 15-А. *Конформационная перестройка в гипотетическом ферменте, индуцируемая связыванием кофактора.* Интенсивность флуоресценции остатков триптофана в гипотетическом ферменте намного больше, чем интенсивность флуоресценции свободного триптофана, и характерная для них $\lambda_{макс}$ флуорес-

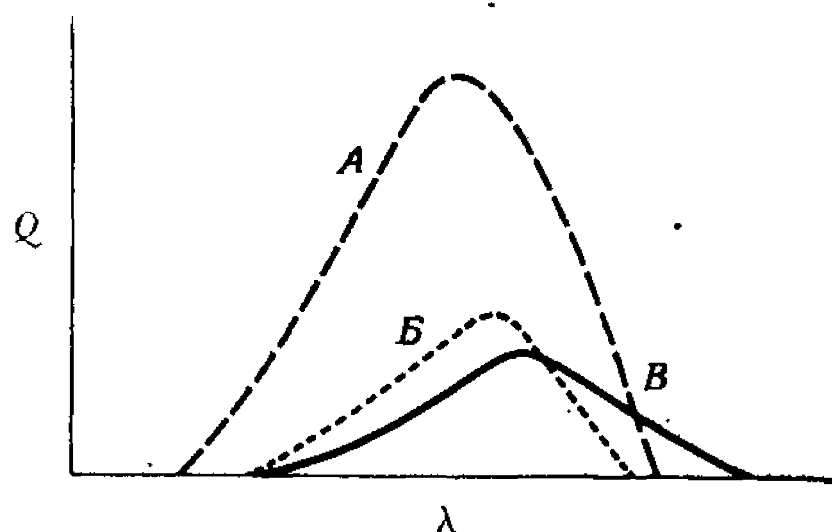


РИС. 15-4.

Спектр флуоресценции гипотетического белка в растворе.

А — без кофактора; *Б* — с добавленным кофактором; *В* — спектр свободного триптофана в воде.

ценции расположена в области более коротких длин волн (рис. 15-4). Значит, они должны находиться в неполярном окружении (правило *2* в табл. 15-1). При добавлении кофактора интенсивность флуоресценции понижается и $\lambda_{макс}$ сдвигается в область более длинных длин волн. Следовательно, конформация фермента должна измениться (правило *4*) так, что либо триптофан становится доступным полярному растворителю — воде, либо он теперь располагается по соседству с заряженными группами. Добавление иодид-ионов или ионов цезия не оказывает влияния на спектр флуоресценции фермента ни до, ни после связывания кофактора. Следовательно, триптофан не попал на поверхность, а, возможно, переместился в более полярную внутреннюю область белка.

Отметим, что ввиду этих изменений флуоресценции величина одного из параметров (например, интенсивность при определенной длине волны, величина $\lambda_{макс}$ или Q) могла быть использована для изучения связывания. Значит, зависимость параметров флуоресценции от концентрации кофактора можно применить для определения стехиометрии связывания и констант диссоциации, используя стандартные методы химии ферментов.

Пример 15-Б. *Свойства активного центра фермента.* Известно, что в гипотетическом ферменте имеется единственный остаток триптофана и что его флуоресценция характеризуется почти такой же $\lambda_{макс}$, как свободного триптофана; на основании этого можно предположить, что остаток триптофана находится в полярном окружении (правило *2*). Можно предположить, что поблизости располагается тушитель, так как величина Q низкая. Титрование фермента при кислых значениях pH приводит к понижению Q, и pK этого перехода такой, как для карбоксила. Следовательно, величина Q обусловлена близостью карбоксила (правило *7*). Добавление субстрата вызывает смещение $\lambda_{макс}$ в область более коротких длин волн и увеличение Q. Смещение $\lambda_{макс}$ указывает на то, что триптофан попадает в менее полярное окружение (правила *2* и *4*). Это может означать, что либо произошел конформационный переход, в результате которого триптофан пе-

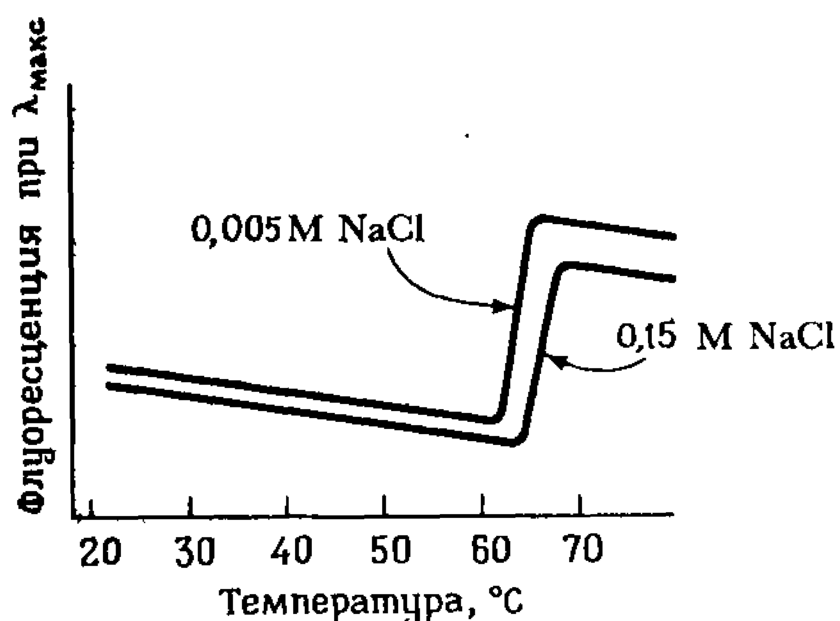


РИС. 15-5.

Изучение перехода спираль—клубок в белке по изменению флуоресценции. Отметим, что в 0,15 M NaCl белок более устойчив, поскольку для осуществления перехода требуется более высокая температура.

реместился в менее полярную область, либо триптофан находится в активном центре или вблизи от него и что связывание субстрата исключает присутствие воды. На основании увеличения *Q* можно предположить, что теперь тушащий эффект карбоксила не имеет места. Вероятное, но не единственное объяснение состоит в том, что триптофан располагается в активном центре и что субстрат связывается или с триптофаном, или с карбоксилом.

Пример 15-В. *Изучение денатурации белка.* При повышении температуры от 20 до 63°C *Q* триптофана гипотетического белка медленно и постепенно падает. Следовательно, остатки триптофана находятся в полярном окружении (правило *5*). Между 63 и 65°C квантовый выход заметно возрастает (рис. 15-5), так что в интервале от 63 до 65°C должен быть конформационный переход, в результате которого меняется доступность остатков триптофана растворителю (правило *5*). Это изменение *Q* может быть использовано для изучения перехода спираль — клубок с тем, чтобы можно было исследовать влияние на процесс различных параметров (например, концентрации соли, pH и т. д.).

Пример 15-Г. *Локализация остатков триптофана в гипотетическом ферменте.* Известно, что в ферменте имеется пять триптофановых остатков, *Q* которых выше, чем свободного триптофана. Это свидетельствует о расположении некоторых из них в неполярных участках (правило *2*). Если белок нагреть от 20 до 55°C, понижение *Q* будет составлять только 35% от величины, найденной для свободного триптофана, что дает возможность предположить, что 0,35·5, или ~2, триптофановых остатка располагаются на поверхности (правило *5*). Если добавить иодид-ион в высокой концентрации, 30% флуоресценции тушится, что также согласуется с наличием двух триптофановых остатков на поверхности (правило *3*). Ни в том, ни в другом случае тушение не равняется 40%, потому что три внутренних триптофановых остатка находятся в относительно неполярном окружении и, следовательно, их вклад составляет *более* трех пятых величины *Q*. Если добавить

субстрат, Q не меняется, что свидетельствует либо об отсутствии триптофана в месте связывания, либо, если триптофан находится в месте связывания, о том, что его окружение имеет полярный характер. Когда с ферментом связан субстрат, иодид тушит только 15% флуоресценции; отсюда $0{,}15/0{,}30 = {}^1/_2$ триптофановых остатков на поверхности недоступна растворителю, когда связан субстрат. Следовательно, ${}^1/_2 \cdot 2 = 1$ триптофан находится в активном центре.

В процессе титрования фермента 18% флуоресценции тушится, а величина рК, связанная с этим тушением, представляет собой рK гистидина. Следовательно, поблизости от одного из триптофановых остатков должен быть гистидин (правило 7). Если фермент титровать после связывания субстрата, Q не меняется, т. е. в присутствии субстрата гистидин не может быть оттитрован. Отсюда в месте связывания содержатся как гистидин, так и триптофан, и субстрат может связываться непосредственно с гистидином.

В примере 15-Г было сделано допущение, что Q всех триптофановых остатков одинаков. На деле это, конечно, не так (например, один или несколько из них могут быть недалеко от карбоксильных групп). Если это допущение неверно, расчет числа триптофановых остатков будет недействительным. Однако ценность этого простого анализа состоит в том, что он предоставляет рабочую гипотезу о структуре белка; эта гипотеза должна затем проверяться другими методами.

Пример 15-Д. *Изучение зависимости конформации белка от концентрации NaCl с помощью тушения иодид-ионом.* На конформацию многих белков в растворе влияет содержание в растворителе NaCl. Это можно изучать, анализируя величину тушения, вызванного иодид-ионом. Рассмотрим, например, белок, для которого по мере уменьшения концентрации NaCl до нуля понижается концентрация иодида, необходимая для того, чтобы вызвать данную степень тушения (рис. 15-6). Следовательно, при низкой концентрации соли структура белка становится более открытой,

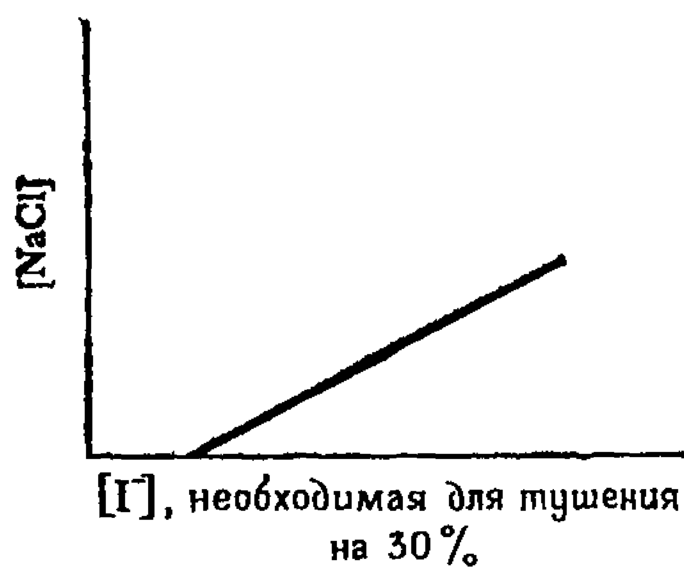


РИС. 15-6.

Зависимость концентрации иодид-иона, необходимой для уменьшения на 30% триптофановой флуоресценции белка, от концентрации NaCl.

так, что большее число триптофановых остатков становится доступным иодиду и может взаимодействовать с ним. К тому же, если в отсутствие NaCl максимальное тушение составляет только 50% от тушения иодидом свободного триптофана, то тогда можно заключить, что в этих условиях структура не может представлять собой беспорядочный клубок, так как 50% триптофановых остатков еще недоступны растворителю. Отметим, что тушение иодидом является общим методом изучения перехода спираль — клубок, индуцированного любым агентом, который не влияет на способность иодида тушить флуоресценцию.

„Внесенная" флуоресценция (метод флуоресцентных меток и зондов)

Природа не всегда снабжает макромолекулу флуоресцирующим хромофором в удобном для экспериментатора участке молекулы. Однако во многих случаях флуоресцирующий хромофор может быть введен в изучаемую молекулу либо путем образования химической связи, либо путем простого связывания * (как при использовании «репортерных» групп в абсорбционной спектроскопии). Использование во флуоресцентном анализе таких дополнительных групп называется методом «внесенной» флуоресценции **. Применимость этого метода ограничена несколькими требованиями к флуоресцирующему хромофору: 1) он должен прочно связываться со строго определенным участком макромолекулы; 2) его флуоресценция должна быть чувствительна к условиям окружения; 3) он сам не должен оказывать влияния на свойства исследуемой макромолекулы. Эти три критерия необходимо всегда проверять. Для белков наиболее распространенными флуоресцирующими метками и зондами являются: 1-анилин-8-нафталинсульфонат-анион (АНС); 1-диметиламинонафталин-5-сульфонат-анион (ДНС) и его хлорангидрид, дансилхлорид; 2-*n*-толуидилнафталин-6-сульфонат-анион (ТНС); родамин; флуоресцеин, а также изотиоцианаты родамина и флуоресцеина. В случае нуклеиновых кислот используются различные акридины (акридиновый оранжевый, профлавин, акрифлавин) и этидийбромид (рис. 15-7). Ценное качество АНС, ДНС и ТНС заключается в том, что в водных растворах они флуоресцируют очень слабо. Од-

---

* Для таких хромофоров используются соответственно термины: «флуоресцентная метка» и «зонд».— *Прим. перев.*

** Русский эквивалент — «метод флуоресцентных меток и зондов».— *Прим. перев.*

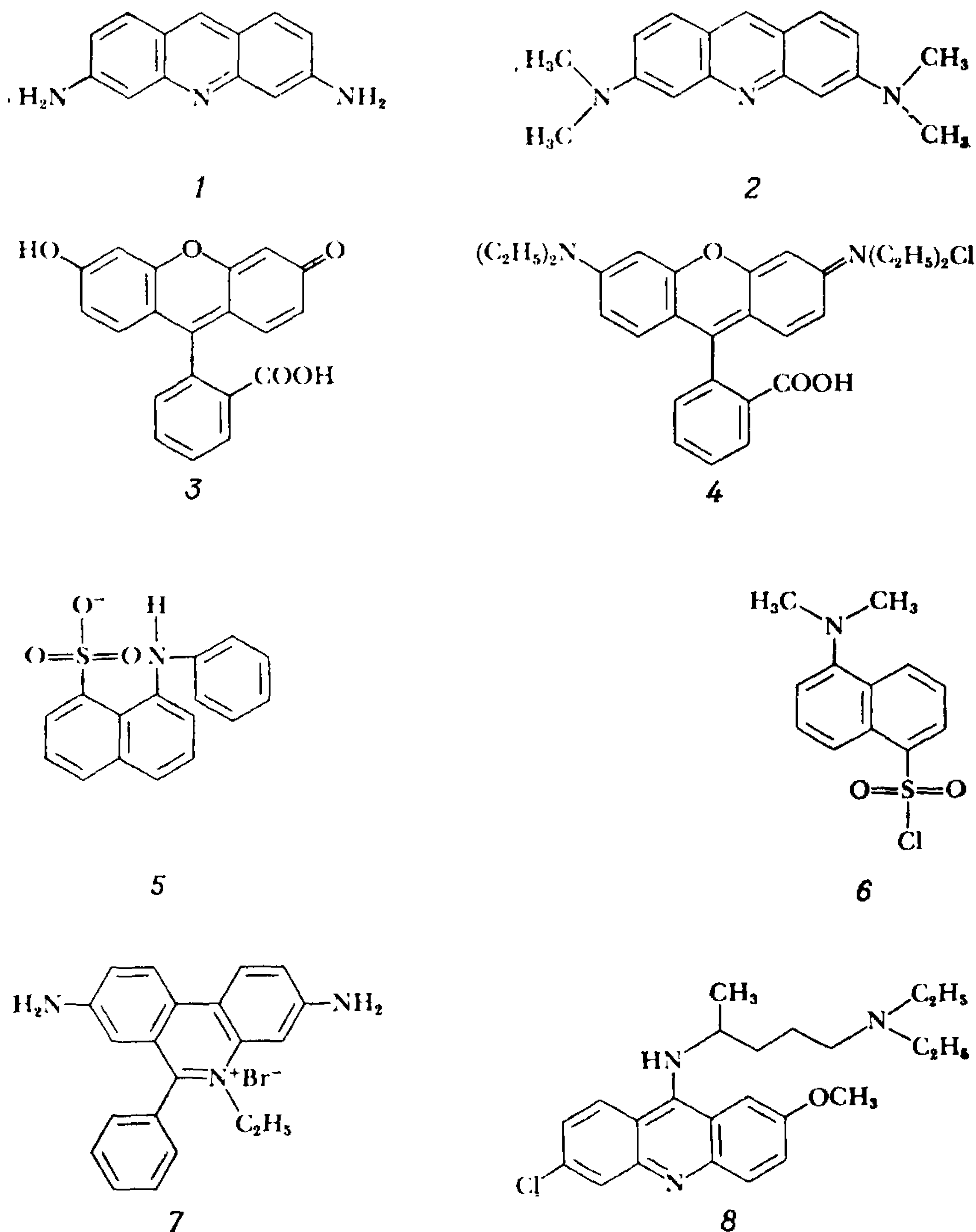


РИС. 15-7.

Структура общеупотребимых флуоресцентных меток и зондов.

1 — профлавин; *2* — акридиновый оранжевый; *3* — флуоресцеин; *4* — родамин В; *5* — 1-анилин-8-нафталинсульфонат-анион (АНС); *6* — дансилхлорид; *7* — этидийбромид; *8* — хинакринхлорид.

нако в неполярном окружении Q заметно увеличивается и спектр сдвигается в область более коротких длин волн, причем оба эффекта возрастают по мере уменьшения полярности окружения (рис. 15-8). Исследование модельных соединений дало возможность установить приблизительное соотношение между Q и степенью «неполярности». Дансилхлорид и изотиоцианаты имеют ценное свойство — они реагируют с определенными аминокислот-

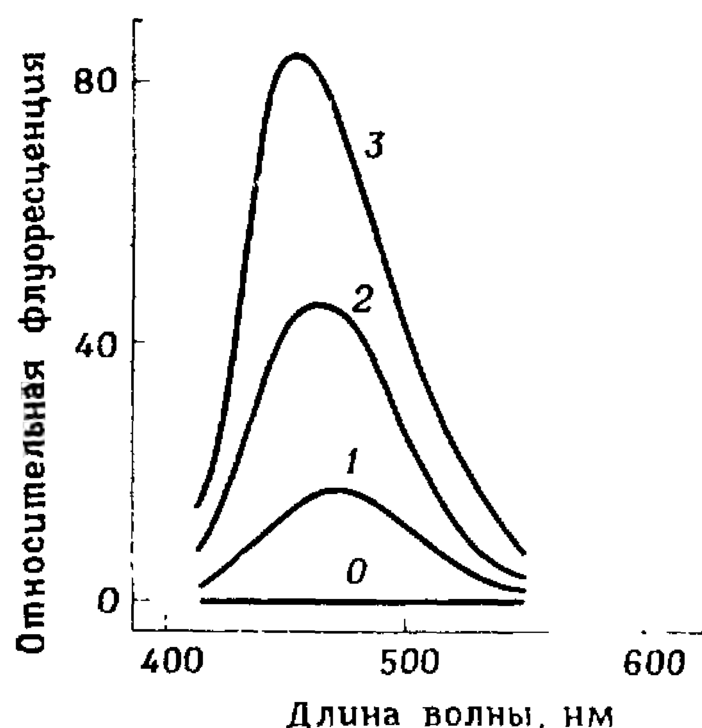


РИС. 15-8.

Эффект добавления сывороточного альбумина быка (САБ) к АНС: 0 означает отсутствие САБ; *1*, *2* и *3* указывают на возрастающие количества САБ.

ными остатками в белках. Эти вещества широко используются для обнаружения неполярных участков в белках, потому что при связывании с такими участками их флуоресценция возрастает.

В следующих примерах показано, как могут быть использованы флуоресцентные метки и зонды.

Пример 15-Е. *Определение свойств участка связывания гема в гемоглобине.* Гемоглобин представляет собой комплекс белка, апогемоглобина, с небольшой простетической группой. Хромофор АНС флуоресцирует при добавлении к растворам апогемоглобина и не флуоресцирует в случае гемоглобина. Прибавление гема к комплексу апогемоглобин — АНС приводит к исчезновению флуоресценции за счет вытеснения АНС, так что АНС и гем должны присоединяться к одному и тому же неполярному участку. Зная точную величину Q для окружения различной полярности и величину спектрального сдвига, можно оценить степень «неполярности».

Исследования такого рода могут дать полезные сведения для интерпретации рентгенограмм. Например, таким образом можно узнать, что некоторые сочетания аминокислот (например, сильнополярные кластеры) не могут быть местом взаимодействия с простетической группой.

Пример 15-Ж. *Обнаружение конформационного перехода в ферменте при связывании субстрата.* При добавлении к α-химотрипсину ТНС флуоресцирует и, следовательно, должен с ним связываться. ТНС не является конкурентным ингибитором ферментативного гидролиза различных субстратов, так что он не может присоединяться к участку связывания субстрата. Однако добавление субстрата вызывает уменьшение флуоресценции. Это уменьшение могло быть результатом уменьшения связывания (ТНС флуоресцирует только в том случае, если он связан) или умень-

шения полярности участка связывания ТНС. Используя флуоресценцию для исследования связывания, получили зависимость флуоресценции от концентрации ТНС в присутствии и в отсутствие субстрата; в обоих случаях константы связывания одинаковы. Следовательно, количество связанного ТНС не уменьшается, а понижение флуоресценции указывает на уменьшение полярности места связывания. Изменение полярности могло происходить в результате перемещения полярной группы около места связывания или в результате «раскрытия» полярной группы — в любом случае конформационный переход вызван связыванием субстрата. Отметим также, что с помощью такого флуоресцентного анализа можно определить параметры связывания субстрата и изучить влияние различных агентов на связывание и на конформационный переход в белке.

Пример 15-З. *Присутствие в сывороточном альбумине быка (САБ) связанных жирных кислот.* Если приготовить различные образцы САБ и добавить АНС, наблюдается флуоресценция АНС, но величины Q и $\lambda_{макс}$ меняются от образца к образцу. Изменение Q ввиду его значительной величины не может быть обусловлено изменением полярности места связывания, и, следовательно, оно происходит благодаря варьированию числа мест связывания, т. е. меньшее количество АНС связано в тех образцах, которые имеют слабую флуоресценцию. Если образцы САБ обработать липофильным растворителем, квантовые выходы и спектральные сдвиги становятся одинаковыми для всех образцов. Очевидно, в результате экстракции липофильным растворителем некоторые неполярные участки становятся недоступными АНС. Однако при анализе содержимого растворителя было показано, что из образцов с сильной флуоресценцией экстрагируются жирные кислоты. Следовательно, так называемые чистые образцы кристаллического САБ могут содержать связанные жирные кислоты. Ясно, что по флуоресценции АНС можно оценивать чистоту образцов САБ и изучать связывание жирных кислот с САБ — например, определять константы связывания.

Пример 15-И. *Определение числа цепей полинуклеотидов.* При связывании с полинуклеотидами наблюдается увеличение квантового выхода Q и сдвиг $\lambda_{макс}$ флуоресцирующего хромофора акридинового оранжевого (рис. 15-9). Когда добавлены насыщающие количества акридинового оранжевого, значения $\lambda_{макс}$ значительно отличаются для двухцепочечных (зеленая флуоресценция) и одноцепочечных (красная флуоресценция) полинуклеотидов. Следовательно, таким простым путем можно различить двух- и одноцепочечные структуры. Если в образце содержатся и одно-, и двухцепочечные полинуклеотиды, в спектре флуоресценции будет два пика, соответствующие двум значениям $\lambda_{макс}$.

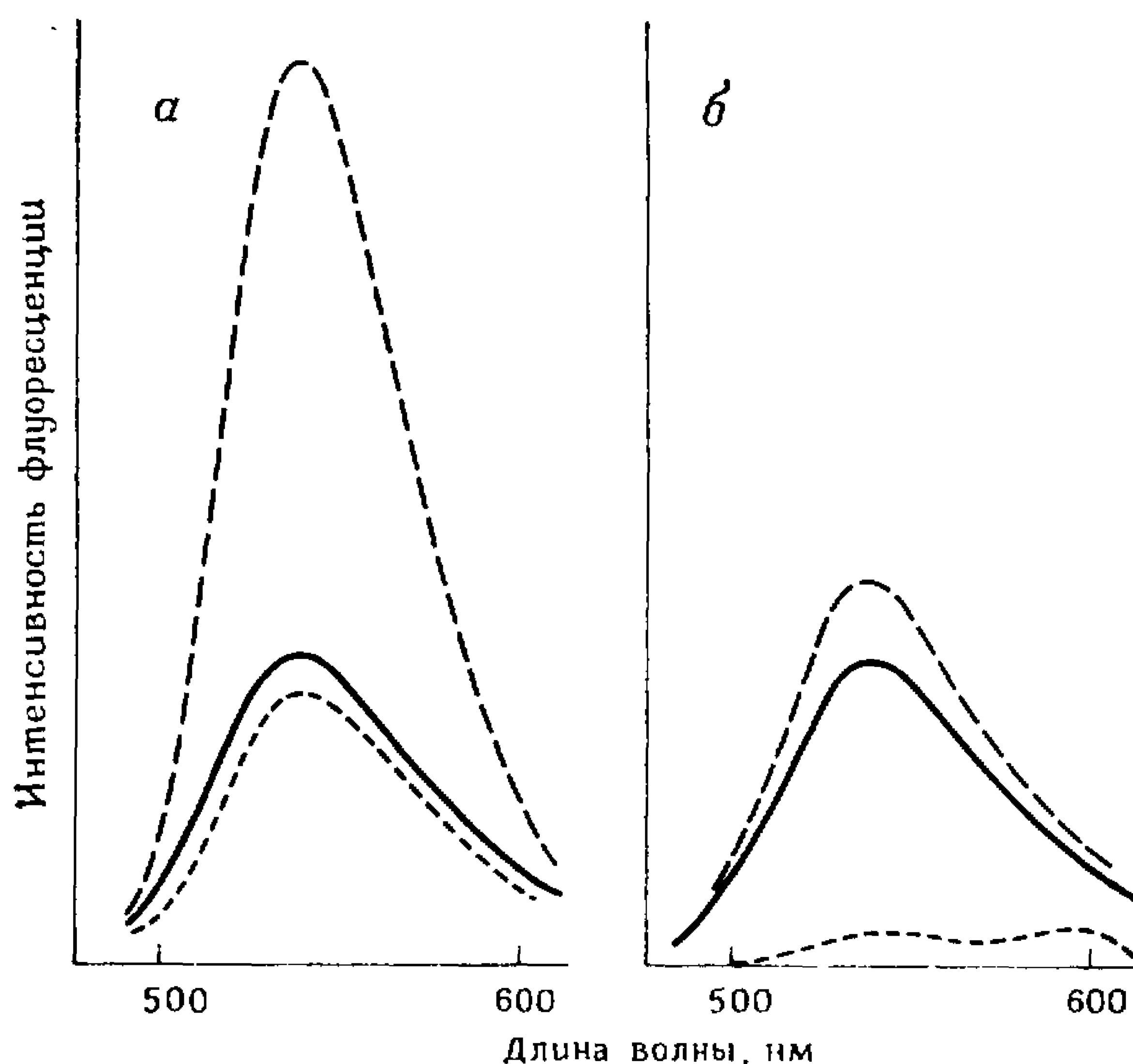


РИС. 15-9.

Влияние двухцепочечных (верхние штриховые линии) полинуклеотидов (например, ДНК) и одноцепочечных (нижние штриховые линии) полинуклеотидов (например, денатурированная ДНК или РНК) на флуоресценцию акридинового оранжевого.

Сплошной линией изображен спектр свободного акридинового оранжевого. Отношение числа молекул красителя к числу нуклеотидных остатков может быть низким (*а*) и высоким (*б*). Отметим, что ДНК вызывает увеличение флуоресценции, не оказывая влияния на $\lambda_{макс}$, и что это увеличение снижается по мере добавления большого количества красителя. Одноцепочечные полинуклеотиды тушат флуоресценцию и сдвигают спектр в красную область. Это объясняет тот факт, что при добавлении к клетке акридинового оранжевого в высокой концентрации ядерный материал дает зеленую флуоресценцию, в то время как цитоплазма, содержащая РНК, — оранжевую.

В разделах, посвященных переносу энергии и поляризации, будут даны другие примеры использования метода флуоресцентных меток и зондов.

Метод флуоресцентных меток и перенос энергии

Рассмотрим систему, содержащую два флуоресцирующих хромофора (*1* и *2*), спектры поглощения и испускания которых показаны на рис. 15-10. Чтобы измерить спектр возбуждения (или действия) флуоресценции, выбирается длина волны (например, λ_3), лежащая в спектре испускания (например, в максимуме)

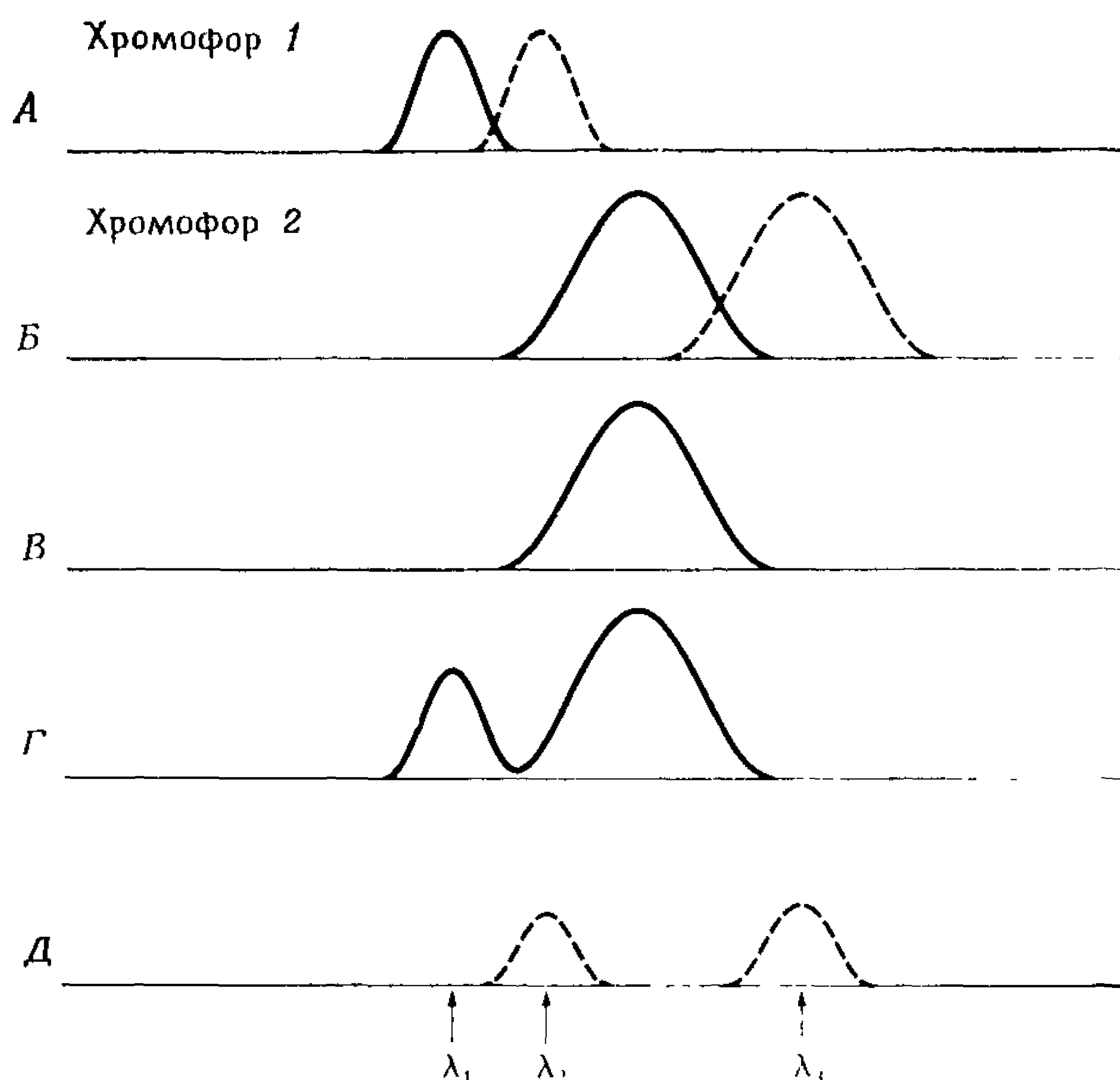


РИС. 15-10.
Спектры двух флуоресцирующих хромофоров (сплошные кривые представляют спектры поглощения или возбуждения, а штриховые линии — спектры испускания).

А и *Б* — спектры поглощения и испускания хромофоров *1* и *2* соответственно; *В* — спектр возбуждения (регистрация при λ_3, соответствующей максимуму в спектре испускания хромофора *2*), когда нет переноса энергии между хромофорами *1* и *2*; *Г* — то же, что и в части *В*, но с переносом энергии; *Д* — спектр испускания, возбуждение при λ_1, когда происходит перенос энергии между хромофорами *1* и *2*.

хромофора *2*. Под спектром возбуждения имеется в виду зависимость интенсивности флуоресценции от длины волны возбуждающего света. Спектр возбуждения будет одинаковым со спектром поглощения (рис. 15-10, *В*) в том случае, если спектр поглощения обусловлен одним электронным переходом. Это не всегда так, но это допущение приемлемо для нашей цели. Однако иногда спектр возбуждения хромофора *2* (рис. 15-10, *Г*) будет очень отличаться от его спектра поглощения, представленного одной полосой тем, что флуоресценция возбуждается при поглощении в области более коротких длин волн по сравнению со спектром поглощения. Это почти всегда происходит из-за того, что в некоторых случаях энергия, поглощенная одним хромофором (донором), может быть безызлучательно передана другому хромофору (акцептору), находящемуся на некотором расстоянии. Это называется *резонансным переносом энергии*, необходимым, но не достаточным условием которого является перекрывание спектра

испускания донора со спектром поглощения акцептора (рис. 15-10) *.

Отметим, что при наличии переноса энергии происходит уменьшение интенсивности флуоресценции хромофора *1* (возбуждение проводят при длине волны, лежащей в спектре поглощения хромофора *1*). Ясно, что это своего рода тушение, особенно в том случае, если молекула акцептора не является флуоресцирующим хромофором. Однако перенос энергии легко обнаружить, снимая полный спектр флуоресценции, потому что будет видно (рис. 15-10, *Д*), что спектр флуоресценции, возбуждаемый при λ_1, содержит новую, более длинноволновую полосу. Другими словами, нужно проверять, имеет ли место безызлучательный перенос энергии всякий раз, когда наблюдаемый спектр испускания нельзя отнести за счет возбуждения при длине волны, которую используют для возбуждения данного хромофора.

До сих пор рассматривался перенос энергии между различными флуоресцирующими хромофорами, но перенос энергии может также иметь место между идентичными флуоресцирующими хромофорами, поскольку спектры поглощения и испускания хромофора часто перекрываются. Признаком такого переноса служит следующее наблюдение: когда в образец вводятся возрастающие количества флуоресцирующего хромофора, интенсивность флуоресценции понижается без понижения поглощения при длине волны возбуждения, т. е. Q уменьшается. (Чтобы это происходило, должны выполняться не только обычные условия, необходимые для переноса энергии, но, кроме того, Q должен быть меньше, чем 1.) Очевидно, что этот вид переноса энергии является своего рода тушением.

Важность явления переноса энергии для биохимических исследований состоит в том, что эффективность переноса зависит от расстояния и взаимного расположения флуоресцирующих хромофоров и поэтому может использоваться для измерения расстояний между молекулами. Эффективность переноса энергии $\mathcal{E}'$ описывается следующим уравнением:

$$\mathcal{E}' = \frac{R_0^6}{\left(R_0^6 + R^6\right)}, \qquad (3)$$

где R — расстояние между донором и акцептором, R_0 — константа для каждой пары донор — акцептор, которая может быть рас-

* Упрощенным было бы то объяснение, что донор излучает фотон, который затем поглощается акцептором, и вероятность переноса энергии есть просто произведение вероятностей испускания и поглощения. Однако, хотя испускание и повторное поглощение, конечно, возможны, это не то, что происходит при резонансном переносе энергии, и вероятность переноса описывается выражением, называемым интегралом перекрывания. [Это различие описано детально в статье *Förster T.*, Disc. Faraday Soc., 27, 7—17 (1959).]

считана по некоторым параметрам спектров поглощения и испускания акцептора и донора. Важность исследования переноса энергии становится очевидной, если уравнение (3) переписать в виде

$$R = R_0 \left(\frac{1-\mathcal{E}'}{\mathcal{E}'}\right)^{1/6}. \qquad (4)$$

(См. гл. 17, в которой обсуждается введение спиновых меток для измерения расстояний между молекулами с помощью ядерного магнитного резонанса.)

Чтобы понять, как измеряется $\mathcal{E}'$, обратимся к рис. 15-10, на котором показаны спектры поглощения и испускания донора и акцептора. Рассмотрим два метода, в которых используются три длины волны, λ_1, λ_2 и λ_3, выбранные следующим образом: при λ_1 поглощает донор и не поглощает акцептор; λ_2 — длина волны, которая имеется в спектре испускания донора и отсутствует в спектре испускания акцептора, и λ_3 — длина волны, лежащая только в спектре испускания акцептора.

Первый метод измерения $\mathcal{E}'$ состоит в определении тушения флуоресценции донора, т. е. тушения флуоресценции при λ_2, если донор возбужден λ_1. Пусть $f_{1,2}$ — интенсивность флуоресценции при λ_2, возбужденной λ_1, а f^D и $f^{D,A}$ соответственно представляют флуоресценцию для случаев, когда присутствует только донор или и донор, и акцептор. Доля молекул донора, которая остается возбужденной, составляет $1-\mathcal{E}'$, или

$$\mathcal{E}' = 1 - \frac{f_{1,2}^{D,A}}{f_{1,2}^{D}}. \qquad (5)$$

Во втором методе измеряется интенсивность испускания при λ_3. В этом случае соответствующее уравнение имеет вид

$$\mathcal{E}' = \left(\frac{\varepsilon_1^A C^A}{\varepsilon_1^D C^D}\right)\left(\frac{f_{1,3}^{D,A}}{f_{1,3}^{A}}\right) - 1, \qquad (6)$$

где $\varepsilon_1{}^A$ и $\varepsilon_1{}^D$ — молярные коэффициенты погашения акцептора и донора соответственно при λ_1; C^A и C^D — концентрации акцептора и донора соответственно и $f_{1,3}{}^A$ и $f_{1,3}{}^{D,A}$—интенсивности флуоресценции при λ_3, возбужденной λ_1, если присутствует соответственно либо акцептор, либо пара донор — акцептор.
После того как измерили $\mathcal{E}'$, если известно R_0, можно оценить R (R_0 обычно рассчитывают из различных спектральных параметров, но иногда определяют, измеряя $\mathcal{E}'$ в системе, для которой известно R).

Чтобы использовать измерения переноса энергии для определения расстояния, желательно, чтобы удовлетворялись следую-

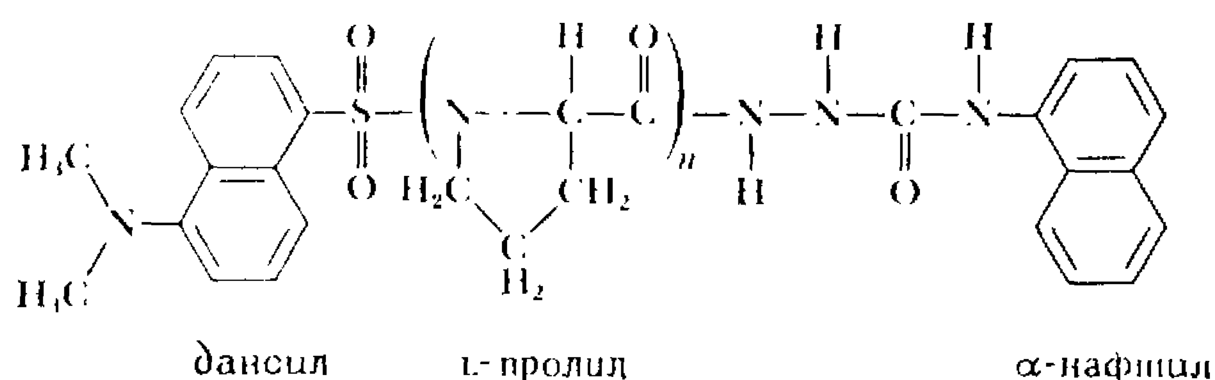


РИС. 15-11.

Формула фрагмента поли-L-пролина, содержащего на концах дансильную (акцептор) и α-нафтильную (донор) группу (n меняется от 1 до 12).

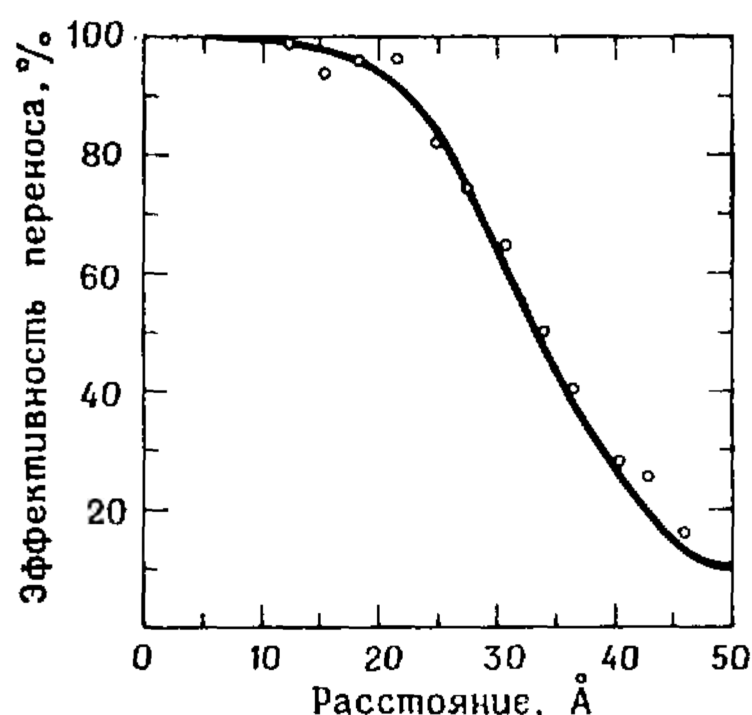


РИС. 15-12.

Эффективность переноса энергии как функция расстояния между хромофорами в дансил-(L-пролил)$_n$-α-нафтиле, где n меняется от 1 до 12. Расстояния (в Å) для каждого значения n были определены с помощью независимых измерений. Сплошная линия соответствует зависимости $1/R^6$. [Из *Stryer L., Haugland R. P.,* Proc. Nat. Acad. Sci., **58**, 719—726 (1957).]

щие условия: 1) система состояла из одного донора и одного акцептора; 2) для данной пары донор — акцептор была бы известна величина R_0, и она должна быть близка к величине измеряемого расстояния; 3) известна взаимная ориентация донора и акцептора, с тем чтобы стало ясно, является ли низкая эффективность переноса энергии результатом большого расстояния или неблагоприятной ориентации (см. гл. 14, в которой обсуждаются эффекты ориентации и поглощение); 4) добавление флуоресцирующих хромофоров не приводило бы к изменению структуры изучаемой макромолекулы.

Пригодность данного метода для определения расстояния была продемонстрирована при изучении линейного полимера, в котором дансильная и α-нафтильная группы разделены фрагментами поли-L-пролина известной длины (рис. 15-11). Эти молекулы были возбуждены при длине волны, лежащей в области поглощения α-нафтильной группы, и была измерена флуоресценция дансильной группы как функция числа пролиновых остатков. Эффективность переноса была рассчитана так, как описано ранее. Когда отложили $\mathcal{E}'$ как функцию длины полипролиновой цепи, было найдено, что она изменяется как $1/R^6$ (рис. 15-12).

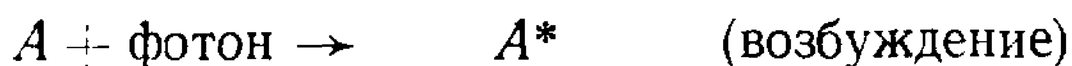
Несколько примеров показывают, какого типа информацию получают путем измерений переноса энергии.

Пример 15-К. *Близость триптофана к активному центру карбоангидразы.* Фермент карбоангидраза содержит в активном центре атом цинка. Если с атомом цинка связан донор — *м*-ацетилбензолсульфаниламид, возбуждение этого хромофора вызывает флуоресценцию триптофана. Следовательно, остаток триптофана должен находиться недалеко от активного центра.

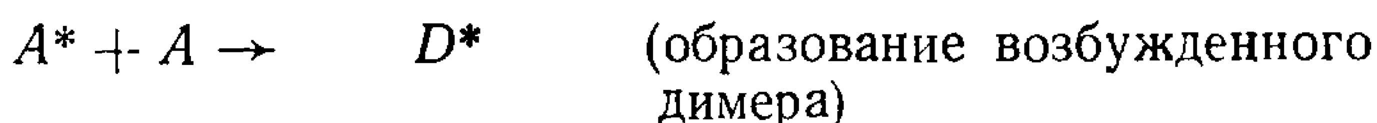
Пример 15-Л. *Расстояние между гидрофобными группами в сывороточном альбумине быка (САБ).* По мере того как возрастают количества АНС, добавленного к САБ, индуцированная флуоресценция АНС вначале возрастает, а затем уменьшается. Причиной уменьшения является перенос энергии между соседними молекулами АНС. Величина эффекта дает приблизительное представление о расстоянии между неполярными участками.

Эксимеры

Изредка возбужденная молекула может образовать комплекс с идентичной невозбужденной молекулой, который будет существовать до тех пор, пока возбужденная молекула излучает. Это описывается следующей схемой, где A — поглощающая молекула, A^* — возбужденная поглощающая молекула и D — димер:



A + фотон → A^* (возбуждение)



$A^* + A$ → D^* (образование возбужденного димера)



D^* → $A + A$ + фотон (флуоресценция димера)

Комплекс D^* называется *эксимером*; его узнают по появлению новой полосы флуоресценции при длинах волн больших, чем таковые обычного спектра испускания. Его спектр возбуждения идентичен со спектром возбуждения мономера в отличие от спектра возбуждения, наблюдаемого при резонансном переносе энергии и состоящего из спектров поглощения донора и акцептора (рис. 15-10).

Образование эксимера — явление, зависящее от концентрации, и его можно использовать, чтобы показать наличие высоких локальных концентраций флуоресцирующего хромофора. До сегодняшнего дня оно очень мало использовалось в биохимии, но, несомненно, найдет применение в будущем. Например, путем исследования эксимеров флуоресцирующих хромофоров можно получить информацию о наличии везикулы или какой-то субчастицы, способной концентрировать некоторые вещества.

Поляризация флуоресценции

Интенсивность поляризованного света, прошедшего через поляризатор, зависит от ориентации поляризатора — пропускание максимально, когда плоскость поляризации света параллельна оси поляризатора, и равно 0, когда перпендикулярна (см. рис. 16-1, *Б*). Поляризация P луча света, который только частично поляризован, может быть определена как

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}, \qquad (7)$$

где $I_{\parallel}$ и $I_{\perp}$ — наблюдаемые интенсивности параллельной и перпендикулярной относительно произвольной оси составляющих излучения. Поляризация может меняться от -1 до $+1$. Она равна нулю, когда свет не поляризован; в остальных случаях ее можно называть *частичной поляризацией*. Поляризацию флуоресценции можно изучать, используя стандартную экспериментальную схему для измерения флуоресценции (рис. 15-3) с несложной модификацией (рис. 15-13): на пути возбуждающего света помещается поляризатор, чтобы возбуждать флуоресценцию образца поляризованным светом, а второй поляризатор помещается между образцом и детектором, причем его ось либо параллельна, либо перпендикулярна оси первого поляризатора.

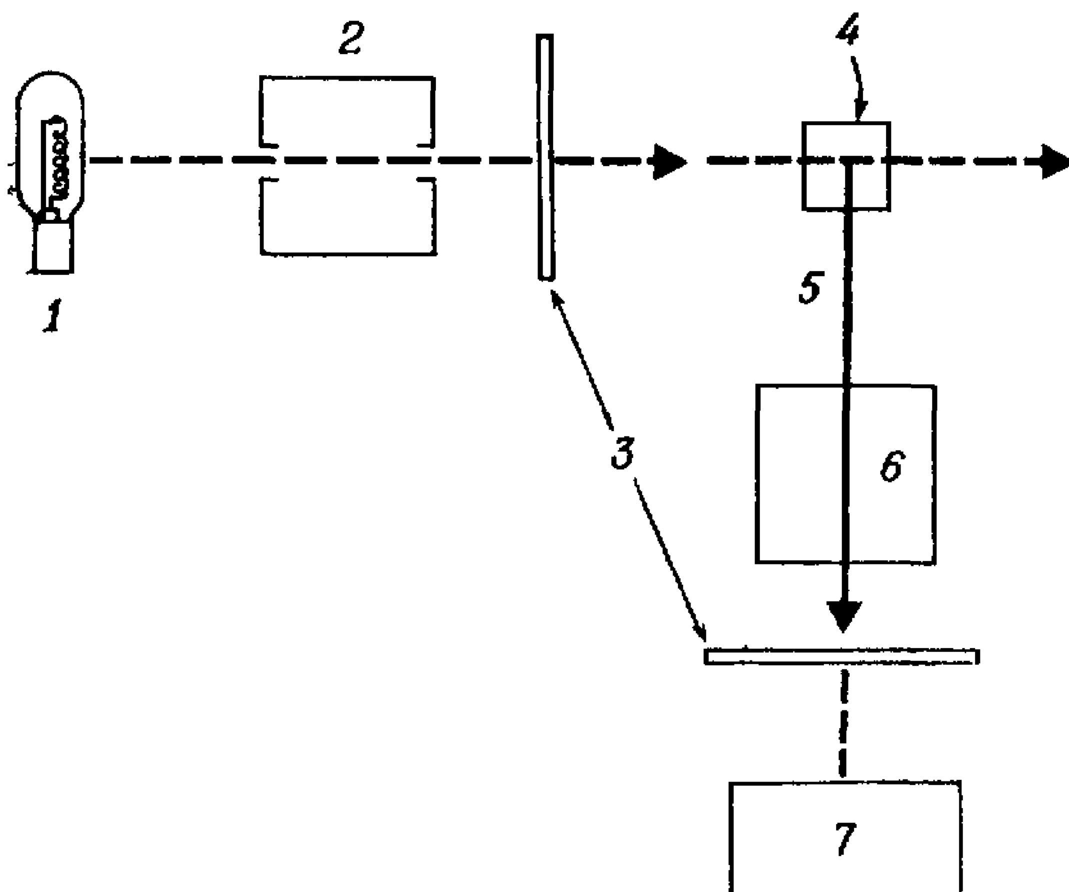


РИС. 15-13.

Схема экспериментальной установки для измерения поляризации флуоресценции.

1 — источник света; *2* — монохроматор возбуждения; *3* — поляризатор; *4* — держатель кюветы с образцом; *5* — испускаемый свет; *6* — монохроматор испускания; *7* — детектор.

Если возбуждающий свет поляризован, то обычно наблюдается, что флуоресценция либо только частично поляризована, либо полностью не поляризована. Причина потери поляризации объясняется дальше; будет показано, что величина изменения поляризации дает информацию о физическом состоянии излучающей группы.

Прежде всего, необходимо напомнить, что поглощение поляризованного света хромофором максимально, когда плоскость поляризации света параллельна особой оси хромофора, называемой электрическим дипольным моментом (см. гл. 16). Обычно хромофоры беспорядочно ориентированы (это, несомненно, справедливо для растворов); следовательно, вероятность поглощения возбуждающего поляризованного света пропорциональна $\cos^2\Theta$, где Θ — угол между плоскостью поляризации и электрическим дипольным моментом. Кроме того, плоскость поляризации испускаемого света определяется не дипольным моментом поглощения, а собственным дипольным моментом перехода (который обычно не параллелен дипольному моменту поглощения), и вероятность испускания флуоресценции с плоскостью поляризации под углом ϕ к дипольному моменту перехода пропорциональна $\sin^2\phi$. Учитывая эти вероятности, получим, что, если поглощающие группы расположены беспорядочно (*но стационарно*) и два диполя не параллельны, поляризация P флуоресценции $<1/2$. (Фактически, даже если поглощающие группы совершенно выравнены по отношению к плоскости поляризации возбуждающего света, величина $P<1$ благодаря $\sin^2\phi$.) Тот факт, что P всегда <1, называется *деполяризацией флуоресценции.*

Многие другие факторы могут увеличивать степень деполяризации; наиболее важными с точки зрения биохимии являются два из них: 1) движение поглощающей группы и 2) перенос энергии между одинаковыми хромофорами. Если излучающая группа вращается очень быстро (т. е. если имеет место броуновское движение), так, что происходит значительное изменение ориентаций за время жизни возбужденного состояния, поляризация будет понижаться дополнительно. Это важное явление, потому что на степень деполяризации такого типа влияют температура, вязкость растворителя, а также размер и форма молекулы, содержащей излучающую группу. Второй фактор — перенос энергии между идентичными хромофорами — обусловлен тем, что, хотя резонансный перенос энергии с наибольшей вероятностью происходит между молекулами, имеющими параллельные диполи, он происходит и в том случае, когда они не параллельны, приводя к деполяризации. Так как эффективность переноса энергии уменьшается с шестой степенью расстояния между донором и акцептором, этот тип деполяризации очень зависит от концентрации.

Собственная (предельная) поляризация P_0 —это поляризация,

которая наблюдалась бы, если бы поглощающая молекула была лишена подвижности и располагалась далеко от всех других молекул (т. е., если бы не было ни эффекта молекулярного движения, ни переноса энергии). На практике это поляризация, наблюдаемая при очень низких концентрациях флуоресцирующего хромофора и в растворителе очень высокой вязкости. Отметим, что под низкой концентрацией может подразумеваться либо низкая концентрация комплекса макромолекула — флуоресцирующий хромофор, либо большое расстояние между хромофорами, связанными с одной макромолекулой. При очень высокой вязкости и высокой концентрации обнаруживается главным образом эффект переноса энергии, а при низкой вязкости и низкой концентрации — эффект молекулярного движения. Эти эффекты могут быть использованы для получения такой информации о макромолекулах, которую нелегко получить другими методами.

Применение поляризации флуоресценции для изучения белков и нуклеиновых кислот

Применяя этот метод для изучения белков, воспользовались главным образом тем фактом, что изменения поляризации обусловлены изменениями подвижности либо всей молекулы, либо ее части *.

Для наблюдения деполяризации, обусловленной этим движением, необходимо достаточно длительное время жизни возбужденного состояния, чтобы до испускания могла происходить переориентация. Как для белков, так и для нуклеиновых кислот время жизни собственной флуоресценции обычно слишком коротко, хотя в случае небольших белков ($M<20\,000$) можно получить некоторую информацию, изучая деполяризацию флуоресценции триптофана. Обычно в поляризационном анализе используются «внесенные» хромофоры.

Для интерпретации данных, полученных путем поляризационных измерений (как и в других методах) используется ряд правил. Основное правило и некоторые общие следствия приведены в табл. 15-2.

В следующих примерах описывается, какую пользу можно извлечь из метода поляризации флуоресценции.

Пример 15-М. *Изучение связывания с использованием поляризации флуоресценции.* Если антиген со введенной флуоресцентной

* Отметим, что обсуждаемая **подвижность** является **вращением,** потому что поступательное движение не будет вызывать деполяризацию. Однако если молекула свободно движется, соударяясь с молекулами растворителя (т. е. путем броуновского движения), очень маловероятно, чтобы она могла двигаться без вращения. По этой причине подвижность может также пониматься в общем смысле просто как способность двигаться.

ТАБЛИЦА 15-2

Основное правило для интерпретации данных по поляризации флуоресценции и несколько следствий из него

Правило

При возрастании подвижности поляризация уменьшается

Следствия

1. Поляризация фактически не проявляется для несвязанных флуоресцирующих хромофоров в растворе, так как они быстро и свободно вращаются. Однако, если они связываются с молекулой, имеющей небольшой молекулярный вес, их поляризация возрастает вследствие некоторого уменьшения подвижности

2. Если флуоресцирующий хромофор связан с макромолекулой, поляризация может стать значительной благодаря сильному уменьшению подвижности. Степень поляризации зависит не только от подвижности всей макромолекулы, но также от подвижности места связывания. Например, если флуоресцирующий хромофор интеркалирует между основаниями ДНК, он прочно удерживается на месте, так что его подвижность — это подвижность молекулы ДНК; если он связан с длинной боковой цепью аминокислоты, его поляризация будет отражать как подвижность всего белка, так и свободу движения боковой цепи по отношению к полипептидной цепи

3. Если с макромолекулой связан флуоресцирующий хромофор и макромолекула агрегирует (например, димеризуется) или связывается с большой молекулой, поляризация возрастает вследствие понижения подвижности частиц

4. Если с макромолекулой связан флуоресцирующий хромофор, и макромолекула претерпевает конформационную перестройку (например, переход спираль — клубок), поляризация уменьшается, когда молекулярная структура становится более беспорядочной, и увеличивается, когда она становится более упорядоченной

меткой взаимодействует с антителом, поляризация флуоресценции возрастает благодаря уменьшению подвижности антигена в комплексе антиген — антитело (следствие *3* в табл. 15-2). Этот эффект может быть использован при изучении связывания целого ряда меченных флуоресцеином антигенов — например, рибонуклеазы, сывороточного альбумина быка, β-цепи инсулина — с соответствующими антителами. Выполняя простые операции, удалось получить константы равновесия и определить стехиометрию связывания; эти данные увеличили наши знания о механизме реакции антиген — антитело.

Связывание флуоресцирующего субстрата ферментом приводит к увеличению поляризации за счет уменьшения подвижности флуоресцирующего хромофора (следствие *2* в табл. 15-2). Этот эффект является чувствительной пробой на наличие фермент-субстратного связывания и может быть использован для определения тех параметров, измерение которых зависит от точного знания количества связанного субстрата (например, констант связывания, стехиометрии).

Пример 15-Н. *Обнаружение ассоциации белков.* Поляризация флуоресценции ДНС-производных α-химотрипсина, химотрипсиногена и лактатдегидрогеназы возрастает, когда белки самоассоциируют, так как увеличение размера частицы приводит к понижению подвижности (следствие *3* в табл. 15-2). Следовательно, измеряя изменения поляризации, можно исследовать самоассоциацию и диссоциацию. Этим путем можно изучать эффекты pH, ионной силы и состава растворителя, так как они оказывают небольшое влияние (или совсем не влияют) на саму поляризацию (т. е. если ферменты так разбавлены что ассоциация невозможна; изменений поляризации под действием этих факторов не наблюдается).

С использованием поляризации флуоресценции ДНС-производных лактатдегидрогеназы (ЛДГ) мышцы (М) и сердца (С) быка была довольно изящно изучена гибридизация этих белков, приводящая к образованию тетрамеров. Некоторые условия (например, низкие величины pH) приводят к *понижению* и поляризации, и ферментативной активности. Так как понижение поляризации указывает на возрастание подвижности или уменьшение молекулярных размеров, эти условия, по-видимому, вызывают диссоциацию тетрамера на мономеры. Переведя С-ЛДГ и М-ЛДГ в предполагаемое мономерное состояние, их обеих можно подвергнуть такой обработке, чтобы ввиду реассоциации возросла поляризация и ферментативная активность. Если до реассоциации смешать диссоциированные С-ЛДГ и М-ЛДГ, то будет тот же эффект, указывающий на то, что в смеси один из ферментов не препятствует реассоциации другого. Если продукт реассоциации затем вновь подвергнуть действию низких pH и, измеряя поляризацию как функцию времени, определить кинетику диссоциации, оказывается, что, согласно кинетике диссоциации реассоциированной смеси, в системе присутствует более двух компонентов. При разделении реассоциированной смеси было показано, что присутствуют гибридные тетрамеры (например, тетрамер, имеющий 3 С-субъединицы и 1 М-субъединицу) и что кинетика диссоциации каждого из них различается. Отметим, что для исследования диссоциации — реассоциации просто использовали величину P и что этот способ является общим для обнаружения гибридизации.

Пример 15-О. *Изучение перехода спираль — клубок в белках.* Для некоторых белков отсутствует простой оптический метод наблюдения перехода спираль — клубок. Если к белку можно присоединить флуоресцирующий хромофор (например, АНС) без изменения конформации, появляется возможность, измеряя поляризацию флуоресценции, наблюдать переход спираль — клубок, потому что, когда белок разворачивается, поляризация

уменьшается вследствие возрастания гибкости молекулы белка (следствие *4* в табл. 15-2).

Метод поляризации флуоресценции может быть также использован для обнаружения S—S-связей в денатурированном белке. Принцип состоит в том, что *предельное состояние бесструктурного неупорядоченного клубка должно характеризоваться максимальной гибкостью* и, следовательно, минимальной поляризацией. Отсюда полностью денатурированная молекула, содержащая S—S-связи, не будет иметь минимальную поляризацию, пока не разорвутся S—S-связи. Это означает, что если добавление агента, разрушающего S—S-связи (например, меркаптоэтанола), приводит к понижению поляризации, то S—S-связи должны были присутствовать вначале. Метод поляризации флуоресценции, вероятно, является наиболее чувствительным методом для обнаружения таких тонких изменений.

Пример 15-П. *Структура комплекса ДНК — флуоресцирующий хромофор: пример определения ориентации красителя по поляризации флуоресценции.* Флуоресцирующий хромофор акридиновый оранжевый прочно связывается с ДНК. Так как он является эффективным мутагеном, структура такого комплекса представляет некоторый интерес. Будучи связанным с ДНК, акридиновый оранжевый не подвергается некоторым свойственным ему химическим реакциям (например, реакции диазотирования), на основании чего можно предположить, что он каким-то образом располагается внутри двойной спирали ДНК. Будучи связанным с ДНК, акридиновый оранжевый флуоресцирует не только при возбуждении в области своей собственной полосы поглощения, но также при возбуждении светом, поглощаемым только основаниями ДНК, что указывает на перенос энергии от оснований. Квантовый выход при этом переносе энергии очень велик, так что акридиновый оранжевый (имеющий плоскую структуру) должен находиться очень близко от оснований. Известно направление плоскости поляризации флуоресценции акридинового оранжевого относительно плоскости его колец и длинной оси, так что, если бы систему лишить подвижности, можно было бы, измеряя плоскость поляризации флуоресценции по отношению к молекулам ДНК (используя свет, поглощенный акридиновым оранжевым, а не основаниями), определить ориентацию молекул акридинового оранжевого относительно ДНК. Флуоресценция акридинового оранжевого сильно поляризована, что указывает на значительное уменьшение подвижности. Если бы он в результате связывания не имел возможности перемещаться относительно спирали ДНК, следовало бы ожидать такую низкую подвижность, поскольку ДНК настолько сильно вытянута, что имеет очень низкий коэффициент диффузии. Недоступность диазотиро-

ванию, близость к основаниям и очевидная жесткость связывания свидетельствуют о том, что слабое связывание с внешними группами, такими, как фосфаты полинуклеотидной цепи, маловероятно. Путем ориентации комплекса акридинового оранжевого и ДНК в потоке через капиллярную трубку (см. гл. 13) была определена плоскость поляризации флуоресценции акридинового оранжевого; оказалось, что плоскость связанного кольца акридинового оранжевого перпендикулярна оси спирали. Так как основания также перпендикулярны оси спирали, а наблюдаемая ранее резонансная миграция энергии указывает на близость друг к другу молекул акридинового оранжевого и оснований, разумно интерпретировать полученные данные следующим образом: акридиновый оранжевый интеркалирует между парами оснований. Это согласуется со слабым связыванием акридинового оранжевого с одноцепочечной ДНК и с многочисленными данными других физических измерений.

Другие применения поляризации флуоресценции

Поляризация флуоресценции может быть использована для определения ориентации молекул в *жестких* системах и гидродинамических свойств некоторых растворов. Далее следует несколько примеров такого рода.

Пример 15-Р. *Определение ориентации молекул хлорофилла в хлоропластах с помощью поляризации собственной флуоресценции.* Поляризацию красной флуоресценции хлорофилла в отдельном хлоропласте можно измерить с помощью флуоресцентного поляризационного микроскопа (см. гл. 2). Путем измерений, выполненных с искусственно иммобилизованным хлорофиллом, были определены углы между плоскостью поляризации флуоресценции и осями хлорофилла. Следовательно, зная из эксперимента плоскость поляризации флуоресценции хлоропластов, можно определить ориентацию молекул хлорофилла в хлоропластах.

Пример 15-С. *Определение ориентации ДНК в хромосомах с помощью поляризации «внесенной» флуоресценции.* В примере 15-П было показано, что флуоресцирующий хромофор акридиновый оранжевый интеркалирует между парами оснований ДНК и что его плоскость перпендикулярна оси спирали. Этот краситель также связывается внутри клеток с хромосомами эукариотов. С помощью флуоресцентного поляризационного микроскопа была измерена поляризация флуоресценции акридинового оранжевого относительно оси вытянутых хромосом, и эти данные были

использованы для определения ориентации ДНК в хромосомах *.

Пример 15-Т. *Определение вязкости внутри живых клеток.* Если флуоресцирующая молекула очень быстро по сравнению со временем жизни возбужденного состояния меняет свою ориентацию, то поляризации флуоресценции не будет или она будет очень слабой (следствие *1* в табл. 15-2). Однако, если она находится в очень вязкой среде, так что ее движение сильно замедленно, поляризация будет наблюдаться. При приблизительно известном времени жизни флуоресценции (и, действительно, времена жизни могут быть измерены) можно определить вязкость среды. Отметим, что в данном случае мы не рассматриваем свойства макромолекулы, а лишь определяем вязкость жидкости, чего нельзя сделать путем прямых вискозиметрических измерений. Была измерена внутриклеточная вязкость в асцитных клетках мыши и в бактерии *E. coli,* причем предварительно эти клетки «поглотили» флуоресцирующую аминокислоту, аминонафтилаланин. Появляется небольшая поляризация; так как известно, что эта аминокислота не связывается ни с какими большими молекулами в клетках, наблюдаемую поляризацию можно использовать для подсчета внутриклеточной вязкости. Это представляет интерес, поскольку появляется возможность оценить скорости диффузии в пределах клетки и определить, могут ли некоторые реакции, лимитируемые диффузией, входить в последовательности реакций, которые составляют различные регуляторные метаболические пути.

Поляризационный анализ с возбуждением в импульсном режиме

Флуоресцентный поляризационный анализ может быть использован для количественного определения коэффициентов вращательной диффузии. Применение для этой цели стандартного метода измерения поляризации флуоресценции имеет два неудобства: 1) с его помощью измеряется усредненная величина, что нежелательно, когда молекула имеет два вращательных коэффициента (например, палочкообразная молекула может вращаться вокруг своей длинной оси или переворачиваться так, что вверху оказывается то один конец, то другой), и 2) он требует измерения собственной поляризации, что выполняется путем изучения поляризации в растворах с возрастающей вязкостью и экстраполяции к бесконечной вязкости. Такая экстраполяция часто не имеет успеха, потому что вещества, добавляемые для увеличения вязкости, иногда оказывают влияние на конформа-

* *MacInnes J. W., Uretz R. B.,* Science, **151**, 689—691 (1966).

цию. Этих осложнений удается избежать, используя *метод наносекундного импульса,* в котором возбуждение достигается с помощью наносекундного (10^{-9}) импульса поляризованного света и регистрируются интенсивности испускаемого света в параллельном ($I_{\parallel}$) и перпендикулярном ($I_{\perp}$) относительно возбуждающего света направлениях. Для вращающейся молекулы имеется начальная разница в этих интенсивностях, которая затухает через несколько наносекунд, так как молекула поворачивается в результате броуновского движения. Скорость затухания связана с вращательным коэффициентом диффузии.

Данные анализируются следующим образом. Измеряют величину анизотропии испускания A как функцию времени;

$$A(t) = \frac{I_{\perp}(t) - I_{\parallel}(t)}{I_{\perp}(t) + 2I_{\parallel}(t)} = A_0 e^{-3t/\rho}, \tag{8}$$

где A_0 — анизотропия в момент возбуждения и ρ — время вращательной релаксации. Зависимость $\lg A$ от t обычно линейна и имеет наклон $-3/\rho$. Если вещество имеет два времени вращательной релаксации, это будет проявляться в наличии двух связанных линий на кривой зависимости $\lg A$ от t (рис. 15-14). Ниже следует пример использования этого метода.

Пример 15-У. *Факторы, определяющие* ρ *для химотрипсина.* К активному центру α-химотрипсина может быть присоединена антранилоильная группа. С помощью метода наносекундного импульса найдено одно значение ρ, равное 52 нс. Эта величина ρ может отражать либо гибкость места связывания антранилоильной группы, либо вращение всего белка (следствие *2* в табл. 15-2). Если допустить, что фактически антранилоильная группа движется независимо от белка, можно рассчитать (из времени вращательной релаксации антраниловой кислоты), что ρ приблизительно равно 1 нс, что несовместимо с измеренной величиной. Если допустить, что белок представляет собой вра-

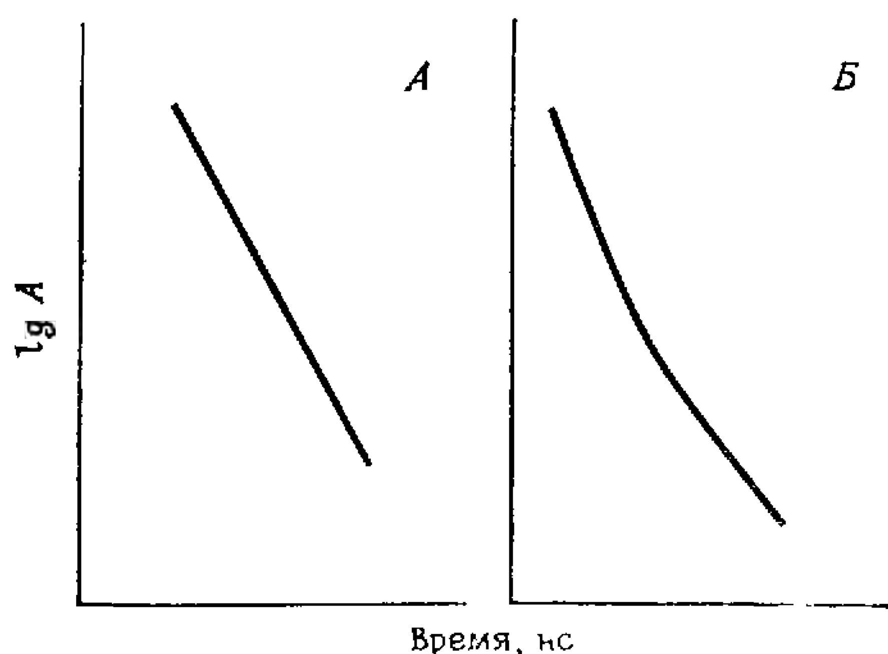


РИС. 15-14.

Зависимость логарифма анизотропии испускания от времени для молекулы, имеющей одно (*А*) и два (*Б*) времени вращательной релаксации.

щающуюся негидратированную сферическую частицу, то $\rho \equiv 3\eta V/kT$, где η — вязкость растворителя, V — объем сферы, k — постоянная Больцмана и T — абсолютная температура. Используя это уравнение и определяя V из молекулярного веса, вычисляют величину ρ. Она равна 22 нс, т. е. тоже слишком мала. Следовательно, химотрипсин должен иметь больший V и должен либо быть гидратирован, либо иметь несферическую форму. Высокая величина ρ показывает также, что активный центр должен быть жестким.

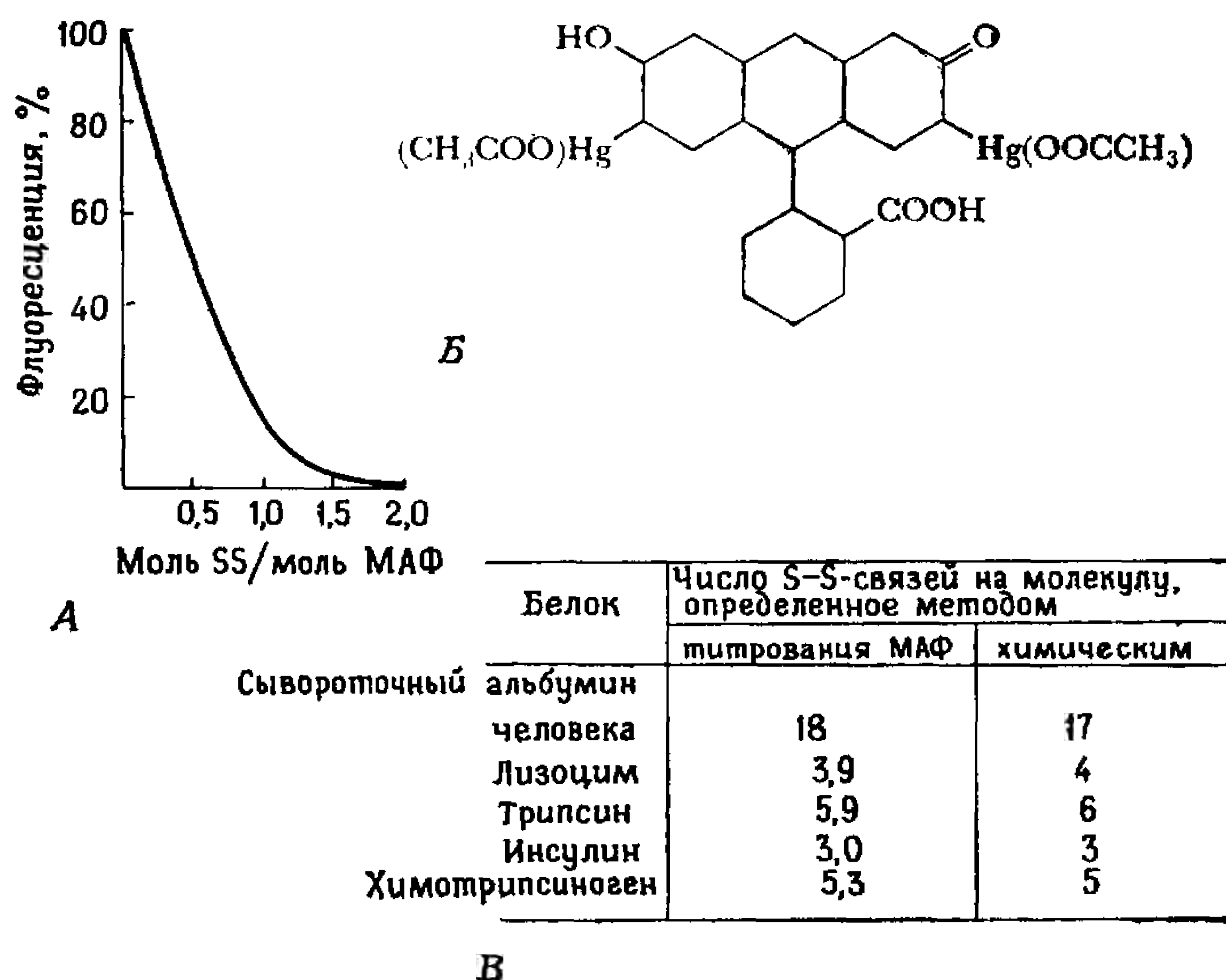
Особые случаи использования флуоресценции в биологии и биохимии

Флуоресценция очень полезна не только для получения информации о конформации макромолекул или о расположении молекул внутри клеток, но и для локализации в пределах клеток и ткани и количественного анализа мельчайших количеств вещества. Далее следуют примеры нескольких таких применений.

Пример 15-Ф. *Флуоресцентная микроскопия.* Многие флуоресцирующие хромофоры локализованы внутри клеток и могут быть обнаружены с помощью флуоресцентной микроскопии. Образец освещается светом с длиной волны возбуждения, и далее ведется наблюдение через фильтр, который задерживает возбуждающий свет и пропускает флуоресценцию. Акридиновый оранжевый связывается с нуклеиновыми кислотами и флуоресцирует в зеленой или оранжевой области в зависимости от того, связан он с ДНК или РНК соответственно. Это было использовано в случае эукариотов для обнаружения нуклеиновых кислот и хромосом и для обнаружения РНК в ядре; в случае прокариотов — для локализации ДНК. (см. гл. 2 и рис. 2-19 и 2-21.)

Пример 15-Х. *Метод флуоресцирующих антител.* Антитело к определенному веществу (например, вирусному антигену или компоненту клеточной стенки) связывается с флуоресцирующим красителем. Если антитело инкубировать с клетками, содержащими антиген, и затем отмыть, то при исследовании клеток с помощью флуоресцентной микроскопии флуоресценция будет наблюдаться только там, где присутствует антиген. Этот метод широко используется для обнаружения антигенов опухолей и для идентификации внутриклеточных вирусов. Более полное описание метода дано в гл. 2, а на рис. 2-20 приведен пример его использования.

Пример 15-Ц. *Определение S—S-связей и SH-групп.* В 1 н. NaOH флуоресценция меркурацетата флуоресцеина потушена



Белок	Число S—S-связей на молекулу, определенное методом	
	титрования МАФ	химическим
Сывороточный альбумин человека	18	17
Лизоцим	3,9	4
Трипсин	5,9	6
Инсулин	3,0	3
Химотрипсиноген	5,3	5

РИС. 15-15.

А — измерение числа S—S-связей по тушению флуоресценции меркурацетата флуоресценна (МАФ); *Б* — структура флуоресцирующего хромофора; *В* — сравнение результатов с данными, полученными другими методами. [Из *Karush F., Klinman N. R., Marks R.*, Analyt. Biochem., **9**, 100—114 (1964).]

дисульфидными связями белка. Этот факт лежит в основе довольно точного способа определения указанных связей. Для калибровки (рис. 15-15) необходимо использовать белок с известным числом S—S-связей и SH-групп (например, рибонуклеазу). При нейтральных значениях pH флуоресценция тушится, наоборот, SH-группами, а не S—S-связями.

Пример 15-Ч. *Исследование ферментов.* Для многочисленных гидролаз (например, холинэстеразы, липазы, гиалуронидазы и β-галактозидазы), оксидоредуктаз (например, арилгидроксилаз, пероксидаз и оксидаз), трансаминаз, дегидрогеназ, изомераз, киназ и декарбоксилаз применяется флуоресцентный анализ, в котором нефлуоресцирующие вещества превращаются во флуоресцирующие и наоборот. Примером необычной чувствительности такого анализа могут служить данные, полученные Б. Ротманом [Proc. Natl. Acad. Sci, **47**, 1981—1991 (1961)], который измерил активность *одной* молекулы β-галактозидазы. Очищенная β-галактозидаза была разбавлена и диспергирована на капельки объемом приблизительно 10^{-9} мл, каждая из которых содержала нефлуоресцирующее вещество флуоресцеинди-(β-D-галактопиранозид) в известной концентрации. При гидролизе это-

го вещества получается флуоресцеин. С помощью микроскопа, снабженного фотоумножителем и имеющего апертуру, позволяющую наблюдать одну каплю, была измерена флуоресценция каждой капли. В этих каплях можно было обнаружить флуоресцеин в концентрации $2 \cdot 10^{-6}$ М или $1,7 \cdot 10^{6}$ молекул на каплю. Так как одна молекула фермента гидролизует приблизительно $2 \cdot 10^{5}$ молекул субстрата в час, флуоресцеин можно было обнаружить спустя приблизительно 10 ч. Метод использовали для определения числа молекул фермента в одной бактерии *E. coli*.

Пример 15-Ш. *Количественное определение ДНК.* Флуоресцирующий хромофор этидийбромид прочно связывается с ДНК; при этом значительно возрастает его квантовый выход. Это увеличение линейно в широких пределах, и данные по интенсивности флуоресценции раствора, содержащего малые количества ДНК и этидийбромид используют для определения конц. ДНК.

Увеличение *Q* также использовалось для обнаружения ДНК, которая подвергалась электрофорезу в полиакриламидном и агарозном гелях (см. рис. 9-11). Если гель, содержащий ДНК, погрузить в раствор этидийбромида, он впитает флуоресцирующий хромофор. Если затем гель подвергнуть действию возбуждающего света, станут видны полосы ДНК в виде зон с интенсивной флуоресценцией.

Список литературы

Chen R. F., Edelhoch H., Steiner R. F., Fluorescence of Proteins, in "Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry", part A., edited by S. J. Leach, Academic Press, 1973, pp. 171—244.

Kronman M. J., Robbins F. M., Buried and Exposed Groups in Proteins, in "Fine Structure of Proteins and Nucleic Acids", vol. 4, edited by G. D. Fasman and S. Timasheff, Dekker, 1970, pp. 271—416.

Pesce A. J., Rosen C. G., Fluorescence Spectroscopy, Dekker, 1971.

Stryer L., Fluorescence Spectroscopy of Proteins, Science, **162**, 526—540 (1968). Хороший обзор по переносу энергии.

Timasheff S. N., Some Physical Probes of Enzyme Structure in Solution, in "The Enzymes", vol. 2, ed. by P. D. Boyer, Academic Press, 1970, pp. 371—443.

Udenfriend S., Fluorescence Assay in Biology and Medicine, vols. 1 and 2, Academic Press, 1962, 1969.

Weber G., Polarisation of the Fluorescence of Macromolecules: 1. Theory and Experimental Methods; 2. Fluorescent Conjugates of Ovalbumin and Bovine Serum Albumin, Biochem. J. **51**, 145—155; 155—167 (1952). Классические статьи по деполяризации флуоресценции.

Weber G., Teale F. W. J., The Interaction of Proteins with Radiation, in "The Proteins", vol. 3, edited by Neurath H., Academic Press, 1966, pp. 445—452.

Задачи

15-1. Белок вызывает флуоресценцию АНС. Если концентрацию белка увеличить до прибавления АНС, флуоресценция понижается. Дать два возможных объяснения понижению флуоресценции.

15-2. Для определения доступности триптофановых остатков растворителю можно использовать тушение триптофановой флуоресценции иодид-ионами.

Известно, что белок содержит только один триптофан, флуоресценция которого не тушится иодид-ионами. Каковы возможные объяснения отсутствия тушения?

Известно, что белок содержит восемь триптофановых остатков и иодид-ионы тушат 25% флуоресценции. Напрашивается предположение, что два триптофановых остатка доступны растворителю. Укажите несколько фактов, которые могли бы сделать это заключение необоснованным.

15-3. Когда образуются эксимеры, их спектр возбуждения совпадает со спектром мономера, потому что мономер возбуждается до димеризации. Если присутствует много димеров и димер возбуждается, можно ли ожидать, что спектр возбуждения будет соответствовать спектру поглощения мономера? Поясните.

15-4. Интенсивность флуоресценции понижается вследствие тушения иодид-ионом. Можно ли ожидать также изменения формы спектров возбуждения и испускания?

15-5. Дайте описание нескольких возможных механизмов возрастания квантового выхода флуоресцирующего хромофора при связывании с ним другой молекулы. Почему иногда могут быть сдвиги спектров возбуждения (или испускания) или обоих вместе? Происходит ли сдвиг в сторону длинных или коротких длин волн?

15-6. Всегда ли спектр возбуждения флуоресцирующего хромофора такой же, как спектр поглощения? Поясните.

15-7. Белок, содержащий десять триптофановых остатков, имеет сильную триптофановую флуоресценцию. Маленькая молекула, способная прочно связываться с белком, фактически не изменяет его флуоресценции, хотя известно, что в участке связывания имеется два триптофановых остатка. Дайте несколько возможных объяснений этому.

15-8. Когда флуоресцирующий хромофор акридиновый оранжевый связывается с ДНК и смесь облучается светом, который поглощается акридиновым оранжевым, в ДНК происходят необратимые химические изменения (например, разрушаются пуриновые кольца, рвутся одноцепочечные спиральные структуры). Чтобы происходили эти изменения, необходимо присутствие молекулярного O_2; поэтому этот процесс называется фотосенсибилизированным окислением или фотоокислением. Такие реакции происходят со многими акридиновыми производными; эффективность реакции приблизительно пропорциональна квантовому выходу флуоресценции. Предложите механизм фотоокисления.

15-9. Флуоресцирующий хромофор ковалентно присоединен к белку. Измерена поляризация флуоресценции в зависимости от ионной силы буфера, в котором суспендирован белок; найдено, что она заметно уменьшается по мере возрастания ионной силы. Как влияет на белок возрастание ионной силы?

15-10. В белке имеется флуоресцирующий хромофор F, ковалентно связанный в одном определенном месте. Когда возбуждают триптофан, триптофановая флуоресценция очень слаба, но флуоресцирующий хромофор сильно испускает. Поясните каждое из следующих возможных наблюдений. (Отметим, что это *альтернативные* и взаимоисключающие наблюдения.)

Иодид-ион тушит флуоресценцию F, а не триптофана.

Иодид-ион тушит флуоресценцию F и триптофана.

Доведение pH до 9 приводит к исчезновению флуоресценции F и увеличению флуоресценции триптофана (допустим, что отсутствует влияние pH на свободный триптофан или несвязанный F).

Доведение pH до 9 приводит к исчезновению флуоресценции триптофана и заметному увеличению флуоресценции F.

ГЛАВА 16

Дисперсия оптического вращения и круговой дихроизм

В этой главе представлена другая группа методов, позволяющих исследовать как конформацию макромолекулы или комплекса с участием макромолекулы в растворе, так и взаимодействия макромолекул. Хотя значительную информацию такого рода дает абсорбционная спектроскопия, изучая взаимодействие с веществом *поляризованного* света, т. е. используя методы дисперсии оптического вращения (ДОВ) и кругового дихроизма (КД) (быстрые и применимые к растворам), можно получить еще более ценную информацию (несмотря на то, что теория метода и применяемые приборы более сложны по сравнению с абсорбционной спектроскопией). С помощью этих методов измеряют в зависимости от длины волны способность оптически активного хромофора вращать плоскополяризованный свет (ДОВ) и по-разному поглощать поляризованный по кругу вправо и влево свет (КД). В основе ДОВ и КД лежат одни и те же физические законы, и фактически оба эти метода представляют собой просто два разных способа изучения одного и того же явления: взаимодействия поляризованного света с *оптически активными* молекулами. Так как оптически активные центры содержатся в большинстве биологических молекул, для изучения последних могут с успехом применяться методы ДОВ и КД.

Известно, что белки и нуклеиновые кислоты можно изучать с помощью методов ДОВ и КД вследствие, в первую очередь, пространственной асимметрии составляющих остов этих макромолекул аминокислот и нуклеотидов, следовательно, ДОВ и КД полезны при структурных исследованиях белков, нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов. Однако еще раз надо напомнить о том, что теория, позволяющая связать спектры с молекулярной структурой, еще недостаточно развита, поэтому используемые для интерпретации спектров рабочие правила (как и правила абсорбционной спектроскопии) носят большей частью эмпирический характер.

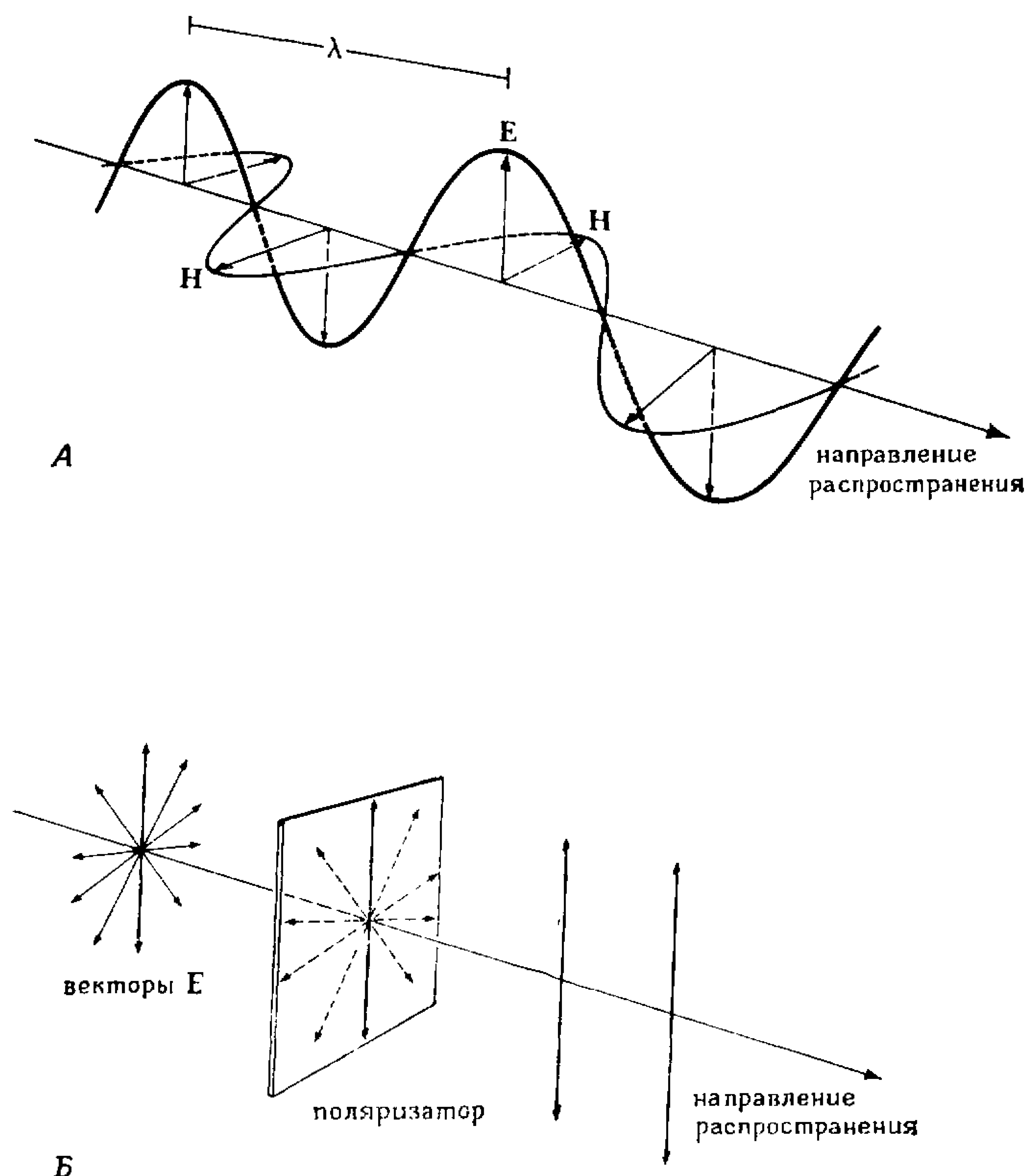


РИС. **16-1.**

А — распространение электромагнитной волны. Путь конца вектора **E** обозначен жирной линией; путь вектора **H** — тонкой. Векторы **E** и **H** взаимно перпендикулярны; плоскость, в которой лежит вектор **E**, называется плоскостью поляризации. *Б* — образование плоскополяризованного света. Поток света падает на поляризатор, который пропускает только те волны, векторы **E** которых параллельны оси поляризатора.

Общая теория ДОВ и КД

В предыдущей главе объяснялось, что свет — это электромагнитная волна, состоящая из осциллирующих электрического (Е) и магнитного (Н) полей, которые можно представить в виде взаимно перпендикулярных векторов (рис. 16-1,*A*). *Плоскость поляризации* определяется как плоскость вектора **E**. Обычно источник света испускает свет с набором волн со всеми возможными ориентациями вектора **E**. Плоскополяризованный свет получают, пропуская свет через объект (например, поляроид или

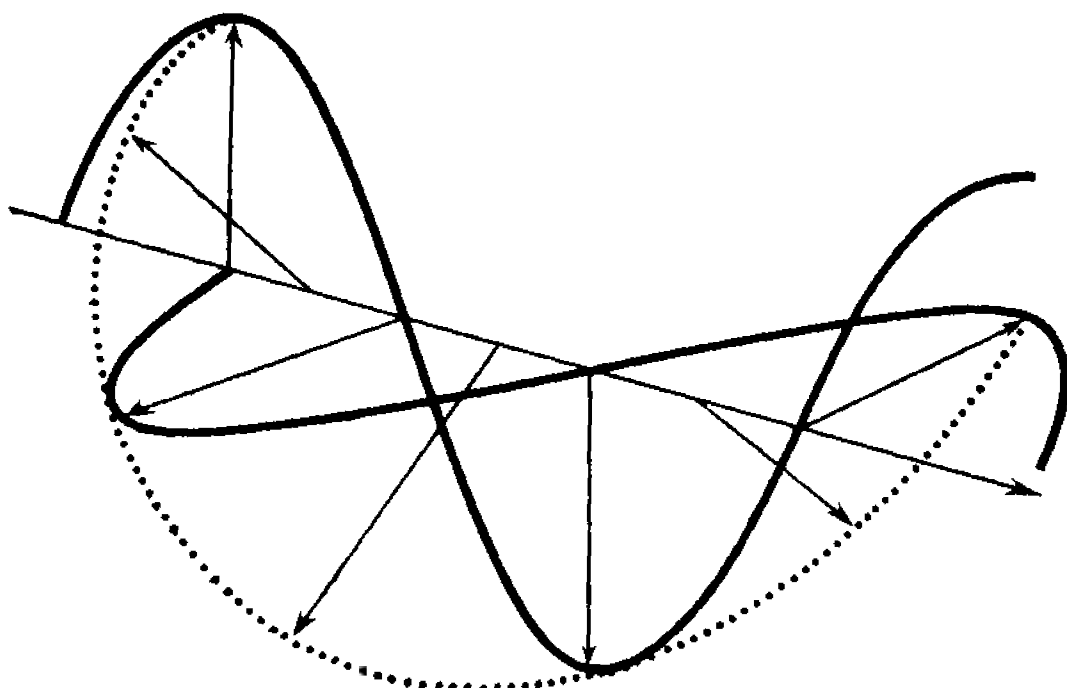


РИС. **16-2.**

Схематические представления возникновения поляризованного по кругу света. Векторы **E** двух электромагнитных волн отличаются по фазе на одну четверть длины волны и взаимно перпендикулярны. Вектор, который является суммой векторов **E** двух компонентов, вращается так, что его конец описывает спираль (линия, обозначенная точками).

призму Николя), который пропускает свет, поляризованный в определенной плоскости (рис. 16, 1, *Б*).

Предположим, что произошло наложение двух плоскополяризованных волн, отличающихся по фазе на одну четвертую длины волны (т. е. когда одна синусоидальная кривая пересекает ось распространения волны, на другой наблюдается максимум или минимум) и имеющих взаимно перпендикулярные векторы **E**. По мере распространения волн результирующий вектор **E** вращается, так что его конец описывает спираль (рис. 16-2). То же самое, конечно, справедливо и для вектора магнитного поля. Такой свет называется *поляризованным по кругу,* и если вектор **E** вращается по часовой стрелке по отношению к наблюдателю, смотрящему на источник света, то — поляризованным по кругу *вправо.*

Если наложить поляризованные по кругу вправо (R) и влево (L) волны равной амплитуды, получится плоскополяризованный свет, поскольку в каждой точке пространства вектора **E** каждой из них будут суммироваться так, как показано на рис. 16-3, *А*. Подобным же образом плоскополяризованный свет может быть разложен на R- и L-компоненты. Если амплитуды двух волн с круговой поляризацией неодинаковы, конец результирующего вектора **E** будет описывать эллипс, и такой свет называется эллиптически-поляризованным (рис. 16-3, *Б*). Для описания эллиптической поляризации часто используют параметр эллиптичности θ. θ представляет собой угол, тангенс которого

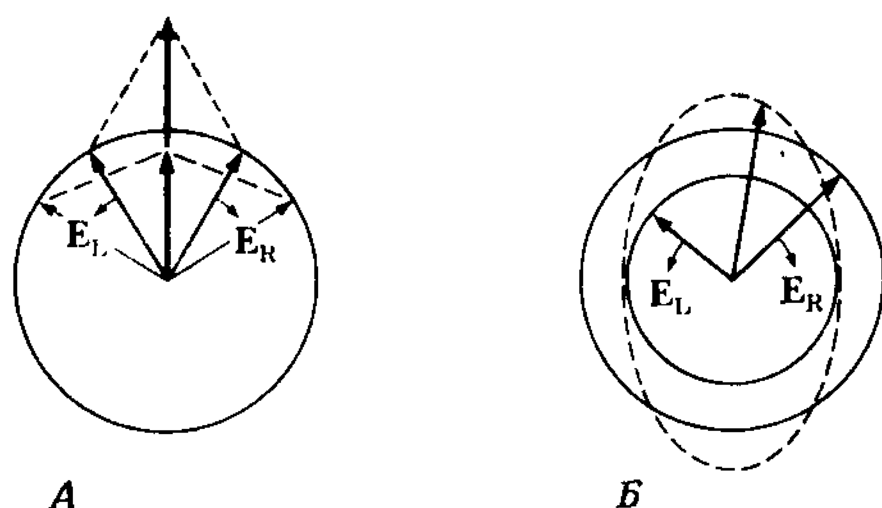


РИС. 16-3.

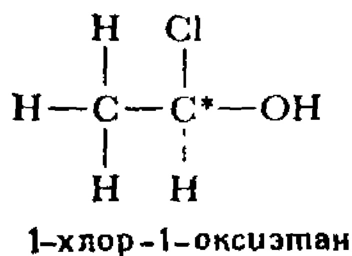
Схемы, показывающие, как складываются поляризованные по кругу влево и вправо лучи света.

А — при одинаковых амплитудах двух волн результирующий свет будет плоскополяризованным; *Б* — если амплитуды отличаются, результирующий свет будет эллиптически-поляризованным, т. е. конец результирующего вектора вычертит эллипс, показанный пунктиром. Длина большой и малой осей эллипса *a* и *b*.

есть отношение малой и большой осей эллипса, показанного на рис. 16-3, *Б*, т. е. $\theta = \operatorname{arctg} \frac{b}{a}$ [см. уравнение (6)].

Когда луч света (т. е. распространяющееся электромагнитное поле) проходит через вещество, электрический вектор **E** распространяющейся волны взаимодействует с электронами атомов. Это взаимодействие приводит к уменьшению скорости распространения света (называемому также *запаздыванием* света) и к уменьшению амплитуды вектора **E**. Уменьшение скорости распространения света связано с *преломлением* и описывается *показателем преломления n*, а уменьшение амплитуды вектора **E** — с *поглощением* и описывается *молярным коэффициентом погашения* ε. И *n*, и ε зависят от длины волны, причем эта зависимость определяется электронной структурой и геометрией молекул.

В результате взаимодействия света, даже если он поляризован, с большинством веществ будут обнаруживаться только преломление и поглощение света. Однако взаимодействие некоторых молекул со светом чувствительно к плоскости поляризации падающего света. Такая молекула, или хромофор, называется *оптически активной;* она характеризуется различными показателями преломления n_L и n_R и молярными коэффициентами погашения ε_L и ε_R для соответственно поляризованных по кругу влево и вправо лучей. Оптическая активность характерна для многих органических веществ и почти всех биологических молекул. Будет хромофор оптически активным или нет, определяется его *асимметрией.* Если молекула асимметрична в том смысле, что она *не может быть совмещена со своим зеркальным отображением,* она является оптически активной. Примеры оптически активных структур даны на рис. 16-4. Здесь не будет объясняться



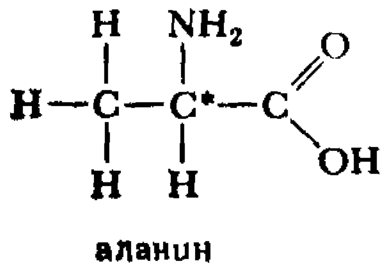




РИС. 16-4.

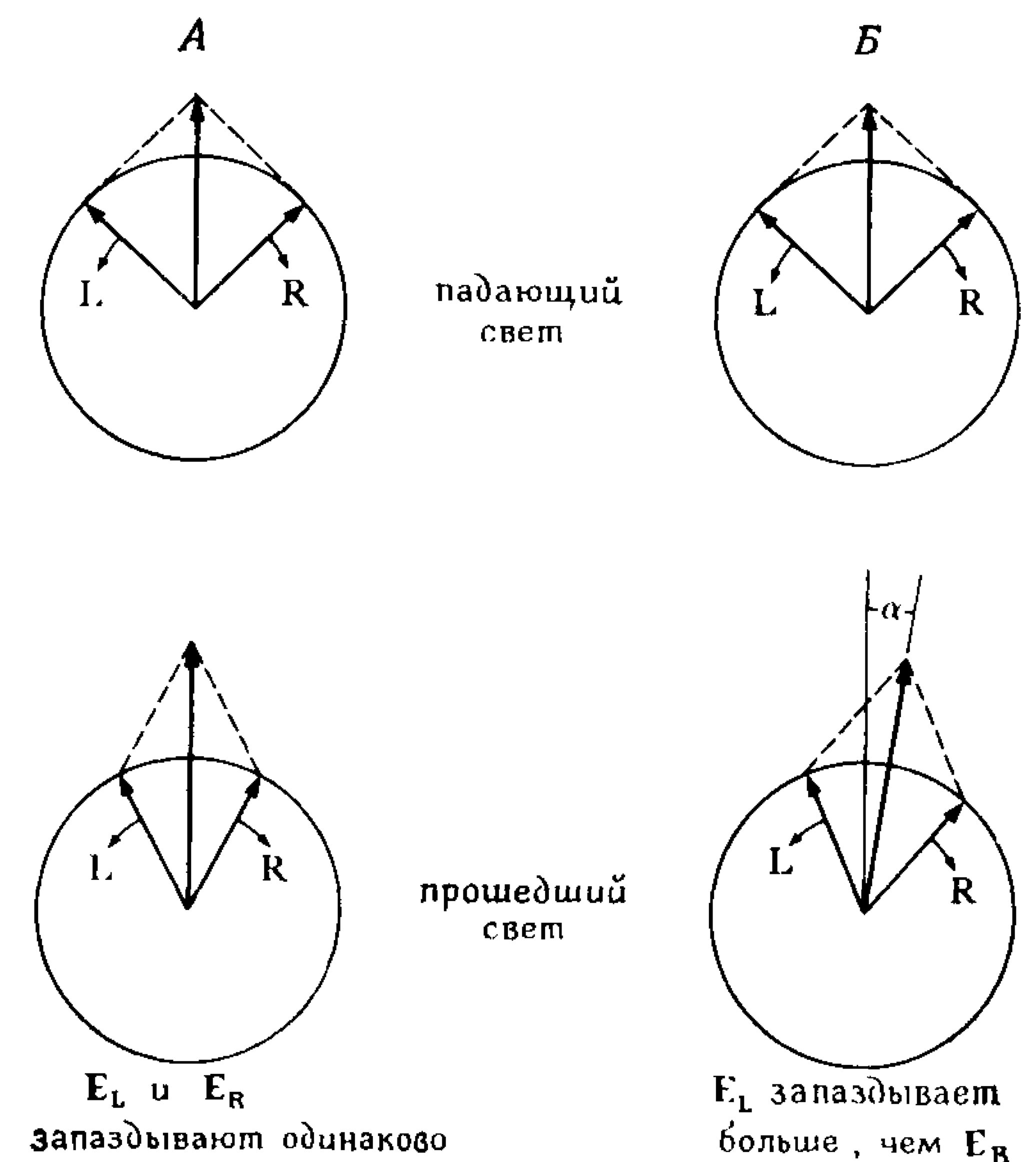
Примеры нескольких оптически активных структур. Асимметрический атом углерода обозначен звездочкой.

физическая основа оптической активности, так как это трудно сделать без привлечения электродинамики и квантовой механики. Соответствующие объяснения можно найти в литературе, приведенной в конце этой главы.

Рассмотрим взаимодействие оптически активного вещества с поляризованным светом. Как указывалось ранее, плоскополяризованную волну можно представить как сумму волн с L- и R-круговой поляризацией. Таким образом, это взаимодействие проще представить в терминах компонентов как взаимодействие веществ с L- и R-компонентами света. Если вещество одинаково замедляет L- и R-волны (т. е. если показатели преломления n_L и n_R одинаковы для поляризованных по кругу L- и R-волн света), то после прохождения вещества L- и R-волны снова соединятся, давая плоскополяризованный свет, причем плоскость поляризации прошедшего луча будет такой же, как плоскость падающего. Однако, если n_L и n_R не равны, каждый из прошедших компонентов света, L и R, замедляется по-разному, так что при выходе из вещества две синусоидальные волны отличаются по фазе (рис. 16-5). С этого времени в любой точке пространства при сложении векторов **E** волн L и R образуется волна, плоскость поляризации которой направлена под углом относительно плоскости поляризации падающей волны; следовательно, плоскость поляризации результирующей волны будет вращаться. Для любого вещества, которое взаимодействует со светом таким путем, величина вращения образца данного объема зависит от числа хромофоров, с которыми взаимодействует волна, т. е. от концентрации молекул, умноженной на длину оптического пути d, а также от длины волны света λ, потому что n всегда зависит от λ.

Наблюдаемый угол вращения α_λ, выраженный в градусах, количественно может быть описан следующим уравнением:

$$\alpha_\lambda = \frac{180^\circ d}{\lambda}(n_L - n_R). \qquad (1)$$



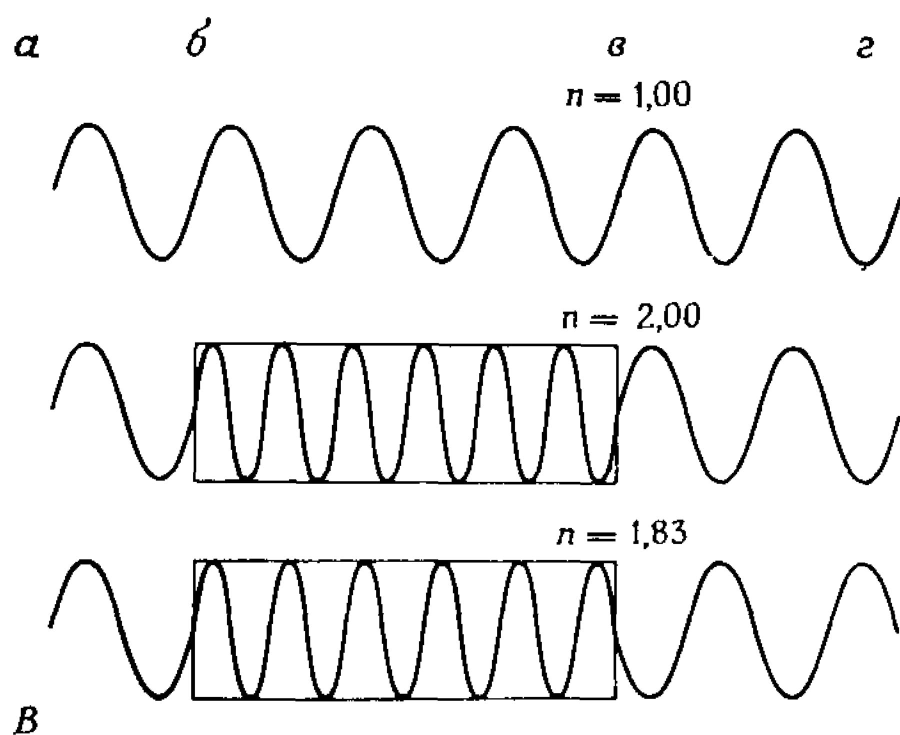


РИС. **16-5.**

Вращение плоскости поляризации света.

А — поляризованные по кругу вправо и влево лучи света запаздывают одинаково, так что результирующий вектор **Е** остается в той же плоскости; *Б* — левый поляризованный по кругу луч света запаздывает больше, чем правый, так что ориентация результирующего вектора **Е** меняется (так как величина запаздывания пропорциональна расстоянию, которое проходит свет, с увеличением длины оптического пути вектор **Е** будет поворачиваться по часовой стрелке на бо́льший угол); *В* — физический смысл запаздывания волны света при его распространении на равные расстояния *а—г* в среде, имеющей различные показатели преломления для L- и R-лучей. Вследствие более низкой скорости света в преломляющей среде и инвариантности частоты на данном отрезке пути в преломляющей среде будет больше колебаний, чем в воздухе (n=1,00). Отметим, что до положения *б* все три луча находятся в одинаковой фазе. В этом примере, если n=2,00, луч выходит в положение *в* в фазе с незапаздывающим лучом. Если n=1,83, он меняет фазу. [Из *Slayter E.*, Optical Methods in Biology, Wiley-Interscience, 1977.]

В большинстве работ используются термины „удельное вращение" $[\alpha]_\lambda$ и „молярное вращение" $[M]_\lambda$. Эти величины определяются как

$$[\alpha]_\lambda = \frac{\alpha_\lambda}{dc}, \tag{2}$$

где α_λ — наблюдаемое вращение в градусах, d — длина пути света в дециметрах и c — концентрация в граммах на миллилитр и

$$[M]_\lambda = \frac{\alpha_\lambda M}{100dc}, \tag{3}$$

где M — молекулярная масса в грамм-молях. Если изучаемое вещество — полимер, как это часто имеет место в биохимии, принято использовать *молярное вращение на остаток* $[m]_\lambda$,

$$[m]_\lambda = \frac{\alpha_\lambda M_0}{100dc}, \tag{4}$$

где M_0 — средняя молекулярная масса, приходящаяся на остаток (т. е. молекулярная масса полимера, разделенная на число мономеров).

Кривая, показывающая зависимость оптического вращения, выраженного в виде α, $[\alpha]$, $[M]$ или $[m]$, от длины волны, называется спектром дисперсии оптического вращения.

До сих пор рассматривалось только *запаздывание* R- и L-волн; интересно также выяснить, что происходит с *интенсивностью* каждой из этих волн, когда они проходят через вещество. Если вещество оптически неактивно, поглощение обеих волн одинаково. Если, с другой стороны, вещество оптически активно, то тогда в интервале длин волн, при которых наблюдается поглощение (полоса поглощения), при каждой длине волны будет поразному поглощаться свет с L- и R-круговой поляризацией. Разность обычно выражается в терминах молярных коэффициентов погашения L- и R-компонентов света, ε_L и ε_R, т. е.

$$\varepsilon_L - \varepsilon_R = \Delta\varepsilon, \tag{5}$$

где $\Delta\varepsilon$ называется *круговым дихроизмом* *, сокращенно КД. КД положителен, если $\varepsilon_L - \varepsilon_R > 0$, и отрицателен, если $\varepsilon_L - \varepsilon_R < 0$. Важно отметить, что, если данная оптически активная молекула характеризуется положительным КД, то ее зеркальное отображе-

---

* Для обозначения величины $\Delta\varepsilon$ используют следующие термины: «разностное дихроичное поглощение» и «круговое дихроичное поглощение».— *Прим. перев.*

ние будет иметь отрицательный КД приблизительно такой же величины. Поскольку различное поглощение L- и R-волн означает, что амплитуды прошедших через вещество волн отличаются, в результате получится, как показано на рис. 16-3, *Б*, эллиптически-поляризованный свет. Экспериментально обычно измеряют $\Delta\varepsilon$, но исторически принято при построении кривой КД откладывать эллиптичность θ; величина $[\theta]$ (см. ниже) связана с $\Delta\varepsilon$ уравнением

$$[\theta] = 3300\Delta\varepsilon. \tag{6}$$

Кривая, показывающая зависимость θ от длины волны, называется *кривой КД* или *спектром КД*.

В большинстве работ используют термины «молярная эллиптичность» и «молярная эллиптичность на остаток». К сожалению, оба этих термина в отличие от молярного вращения и молярного вращения на остаток в случае дисперсии оптического вращения имеют одинаковое обозначение

$$[\theta]_\lambda = \frac{M\theta_\lambda}{10dc}, \tag{7}$$

где θ_λ — наблюдаемая эллиптичность в градусах, M — молекулярная масса или средняя молекулярная масса, приходящаяся на остаток, d — длина пути в сантиметрах и c — концентрация в граммах на миллилитр.

Полезно рассмотреть, как связаны обычная кривая дисперсии (т. е. зависимость показателя преломления n от длины волны λ), кривая ДОВ (которая фактически является зависимостью $\Delta n = n_L - n_R$ от λ), обычная кривая поглощения (ε от λ) и кривая КД ($\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$ от λ). На рис. 16-6 показаны типы кривых, полученных для одной полосы поглощения оптически активного хромофора. Сплошная кривая на рис. 16-6, *А* соответствует спектру поглощения неполяризованного света; например, для одноэлектронного перехода из основного состояния в первое возбужденное состояние. Длина волны, соответствующая максимуму поглощения λ_0, часто называется максимумом поглощения или $\lambda_{макс}$. Эту полосу поглощения можно, кроме того, охарактеризовать величиной Δ или полушириной на расстоянии, составляющем $1/e$ часть от максимальной высоты. Сплошная линия на рис. 16-6, *Б* изображает зависимость показателя преломления n неполяризованного света от длины волны. Основные характерные черты этой кривой состоят в том, что: 1) $n=1$ при $\lambda=\lambda_0$; 2) часть кривой, расположенная слева от λ_0, может быть наложена на правую часть путем поворота на 180°; 3) длины волн, соответствующие максимуму и минимуму n, равны приблизительно $\lambda_0+0{,}9\Delta$ и $\lambda_0-0{,}9\Delta$ соответственно и 4) при длинах волн, находящихся вне

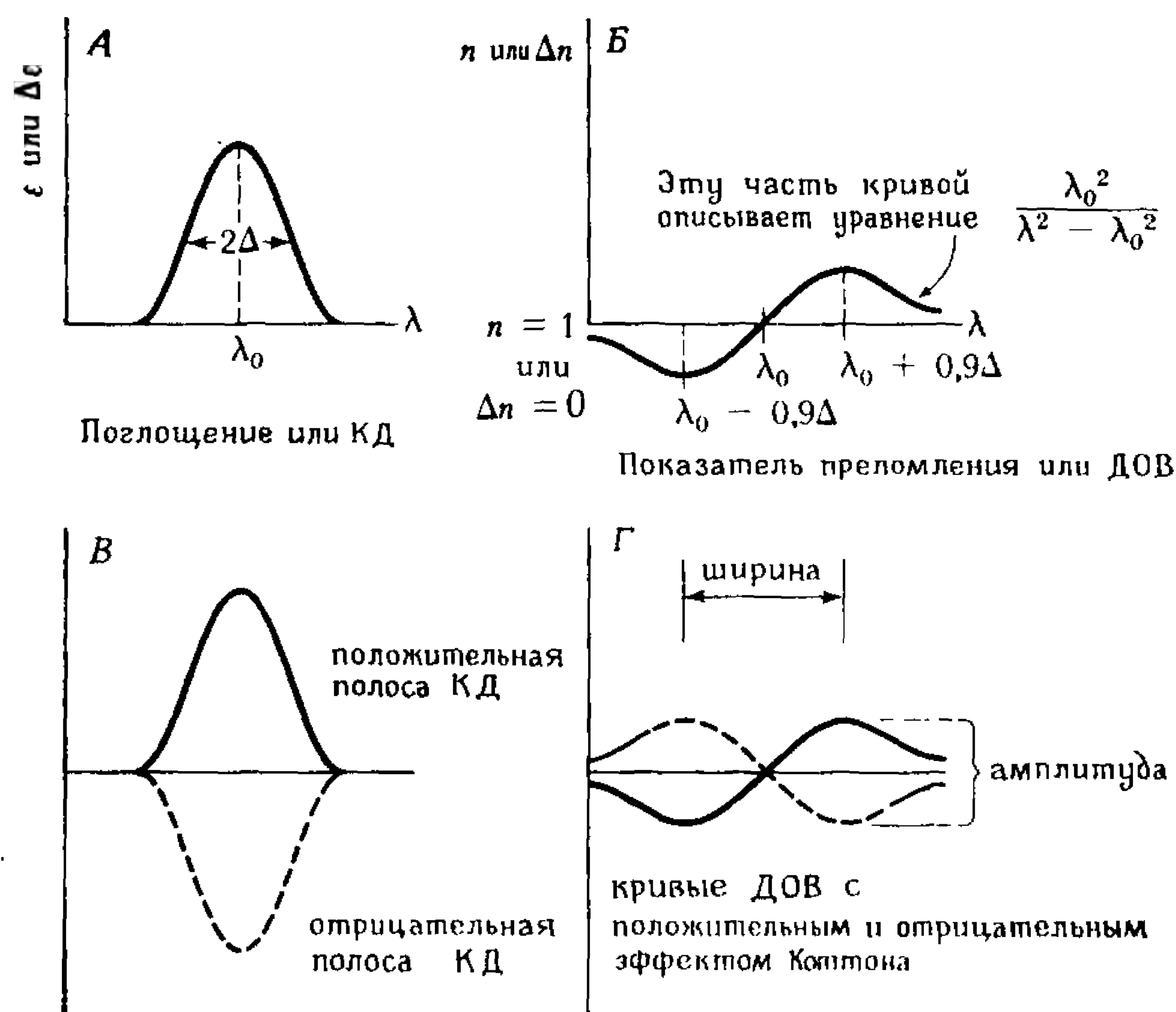


РИС. **16-6.**

Связь между (*А*) спектрами поглощения (ε от λ) и кругового дихроизма (Δε от λ) и (*Б*) кривыми дисперсии (*n* от λ) и дисперсии оптического вращения (Δ*n* от λ) для оптически активного вещества (отметим, что символ Δ используется как для обозначения параметров по оси ординат, так и для ширины полосы, — к сожалению, общепринятое обозначение); (*В*) сплошной линией представлена положительная полоса КД (положительный эффект Коттона), а штриховой линией — отрицательная (отрицательный эффект Коттона); (*Г*) сплошная линия называется кривой ДОВ с положительным эффектом Коттона, а штриховая — с отрицательным. Если вещество оптически неактивно, кривые *n* от λ и ε от λ будут того же типа, а Δε и Δ*n* равны нулю при всех λ.

полосы поглощения, *n* асимптотически приближается к 1. Если хромофор оптически активен, кривые КД и ДОВ имеют по существу тот же вид, что и соответственно спектр поглощения и кривая дисперсии, за исключением того, что по оси ординат откладывается $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$ и $\Delta n = n_L - n_R$. Обычно при представлении кривых ДОВ по оси ординат откладывается какой-нибудь из параметров, обозначающих вращение (например, [α] или [*M*]), но необходимо помнить, что вращение — результат различия в показателях преломления L- и R-лучей света.

Кривая ДОВ, имеющая вид, как на рис. 16-6, *Б*, называется кривой ДОВ с *эффектом Коттона*. Эффекты Коттона, как показано на рис. 16-6, *Г*, могут быть отрицательными или положительными. Если оптически активная молекула характеризуется положительным эффектом Коттона, для ее зеркального отображения будет наблюдаться отрицательный эффект Коттона точно

такой же формы. Каждая кривая с эффектом Коттона состоит из двух экстремумов, называемых *пиком* и *впадиной*; величина Δn при длине волны, соответствующей максимуму пика, всегда такая же, как величина Δn для впадины, а знак противоположный. Для описания эффекта Коттона, как показано на рис. 16-6, *Г*, используются еще два параметра — амплитуда и ширина. Кривая с эффектом Коттона в той ее части, где она постепенно убывает по направлению от полосы поглощения, называется *плавной кривой*. В настоящее время их редко изучают; но у них есть одно полезное свойство — они простираются очень далеко от полосы поглощения и поэтому могут быть использованы для приблизительного определения некоторых параметров молекулы в растворителе, сильно поглощающем в области λ_0. Основной эффект Коттона белков и полипептидов наблюдается при длине волны около 200 нм; он связан с поглощением пептидной связи. Для нуклеиновых кислот он наблюдается в интервале от 250 до 275 нм и определяется электронными переходами в основаниях нуклеотидов.

Полосы (максимумы) КД могут также быть положительными или отрицательными, как показано на рис. 16-6, *В*, и называются положительным или отрицательным эффектом Коттона. Положительная полоса КД всегда соответствует положительному эффекту Коттона на кривой ДОВ.

Полоса КД может быть, кроме того, охарактеризована высотой, т. е. величиной θ при λ_0, которая до некоторой степени есть мера асимметрии. Однако в случае КД более принято использовать *силу вращения* R полосы — площадь под кривой зависимости $\Delta\varepsilon$ от λ. Силу вращения трудно вычислить точно, и ее обычно рассчитывают приблизительно как площадь под гауссовой кривой

$$R \sim 1{,}23 \cdot 10^{-42} [\theta_0] \frac{\Delta}{\lambda_0}, \qquad (8)$$

где λ_0 — длина волны, соответствующая точке максимума на кривой КД, $[\theta_0]$ — это $[\theta]$ при λ_0 и Δ — полуширина полосы при $1/e$ от высоты. Ее можно также измерить с помощью анализатора кривых *.

Сила вращения характеризует *интенсивность* полосы КД; из физического смысла этой величины следует некоторая информация о «легкости» перехода электронов из основного в возбужденное состояние при поглощении света. Для того чтобы интерпретировать данные КД, нет необходимости истолковывать в деталях факторы, которые определяют величину R. Главное правило состоит в том, что R не равна нулю для оптически активного ве-

* Анализатор кривых — электронный прибор, который может: 1) измерять площадь под кривой и 2) раскладывать кривую на ряд гауссовых кривых, сумма которых дает первоначальную кривую.

щества и что она, как правило, возрастает с увеличением асимметрии *.

Относительная оценка методов ДОВ и КД

На основании всего сказанного должно стать очевидным, что как ДОВ, так и КД являются проявлениями одного и того же физического явления. Действительно, как и следовало ожидать, спектры ДОВ и КД можно выводить один из другого. Это делается посредством математических превращений, называемых общими преобразованиями Кронига — Крамерса, которые можно найти в специальных монографиях, перечисленных в конце главы.

Использование методов ДОВ и КД для получения информации о макромолекулах определяется в первую очередь доступностью необходимой аппаратуры. Вначале были доступны только приборы для измерения ДОВ. Кроме того, приблизительно до 1960 г. на этих приборах можно было работать только в области значительно больших длин волн, чем длины волн, соответствующие полосам поглощения белков и нуклеиновых кислот. В результате этого доступными для изучения были только плавные кривые. Кривые ДОВ такого типа обычно анализировали с помощью отношения, называемого уравнением Друде:

$$[\alpha]'_\lambda = \frac{A}{\lambda^2 - \lambda_0^2}, \qquad (9)$$

где $[\alpha]'_\lambda = \alpha_\lambda / dc$ [см. уравнение (2)], а λ— длина волны, при которой измеряется $[\alpha]'_\lambda$; λ_0 называлась *постоянной дисперсии* [часто обозначаемой λ_c], которая, как было доказано позднее, оказалась длиной волны, отвечающей центру полосы поглощения; A называлась *постоянной вращения* и в дальнейшем было показано, что она равна $2R\lambda_0^2/(0{,}696 \cdot 10^{-42}\pi)$, где R — сила вращения. Было ясно, что это уравнение не может быть правильным, так как оно предсказывает бесконечное вращение при $\lambda = \lambda_0$; тем не менее только оно имелось в распоряжении исследователей в то время и путем определения λ_0 и A на самом деле удавалось получить некоторую информацию. С помощью различных эмпирических подходов было показано, что λ_0 и A могут быть определен-

* Из этого заключения вытекает естественное следствие: иногда вещество, либо не обладающее оптической активностью, либо с низким значением R, может достичь очень высоких значений R, взаимодействуя с полярной асимметричной молекулой.

ным образом связаны с конформацией макромолекул. В течение раннего периода, при применении довольно несовершенной аппаратуры, для анализа данных использовали и другие уравнения. Из них можно выделить состоящее из многих параметров уравнение Моффита. Применяя это уравнение, пытались связать форму плавной кривой и соответствующие ей величины вращения с долей аминокислотных остатков в белке, образующих конформацию * α-спирали или беспорядочного клубка. В более поздние годы аппаратура для измерения ДОВ была усовершенствована, так что интервал измерений был расширен до далекого ультрафиолета, что позволило работать в областях поглощения белков и нуклеиновых кислот, т. е. наблюдать эффекты Коттона. Как будет видно из следующих разделов этой главы, анализ эффектов Коттона позволяет получить большое количество информации.

Однако в конце 1960-х годов стали доступны приборы для измерения КД и ввиду простоты кривой КД по сравнению с кривой ДОВ с эффектом Коттона (см. рис. 16-6) метод КД стал использоваться намного более широко, чем ДОВ; в настоящее время ДОВ применяется редко.

Главное преимущество изучения КД состоит в том, что этот метод позволяет значительно лучше разрешить полосы (положительные и отрицательные максимумы), обусловленные различными оптически активными переходами. Это лучше всего видно при исследовании кривых, содержащих более чем одну полосу. Сначала, обращаясь к рис. 16-6, где показаны ДОВ и КД индивидуального оптически активного вещества, следует отметить, что ни в одной точке кривая ДОВ не достигает нулевой линии; кривые асимптотичны. Однако кривая КД вне полосы поглощения сливается с нулевой линией. Кроме того, полосы КД узкие, поэтому можно довольно хорошо разрешить соседние полосы.

На рис. 16-7, *А* изображены спектры ДОВ и КД, которые получились бы, если бы молекула содержала два оптически активных центра, дающих очень близко один от другого два эффекта Коттона. Отметим, что на спектре КД ясно видно наличие двух элементов, в то время как кривая ДОВ довольно сложная. Еще более выразителен рис. 16-7, *Б,* на котором приведены результаты, полученные для молекулы, имеющей значительный эффект Коттона при одной длине волны и очень слабый — на некотором расстоянии от первого. Так как спектры ДОВ полностью перекрываются, слабая полоса почти не обнаруживается, в то время как

---

* Здесь и далее для описания пространственной структуры молекул мы будем пользоваться термином «конформация». (В оригинале термины «конформация» и «конфигурация» необоснованно используются как синонимы.) — *Прим. перев.*

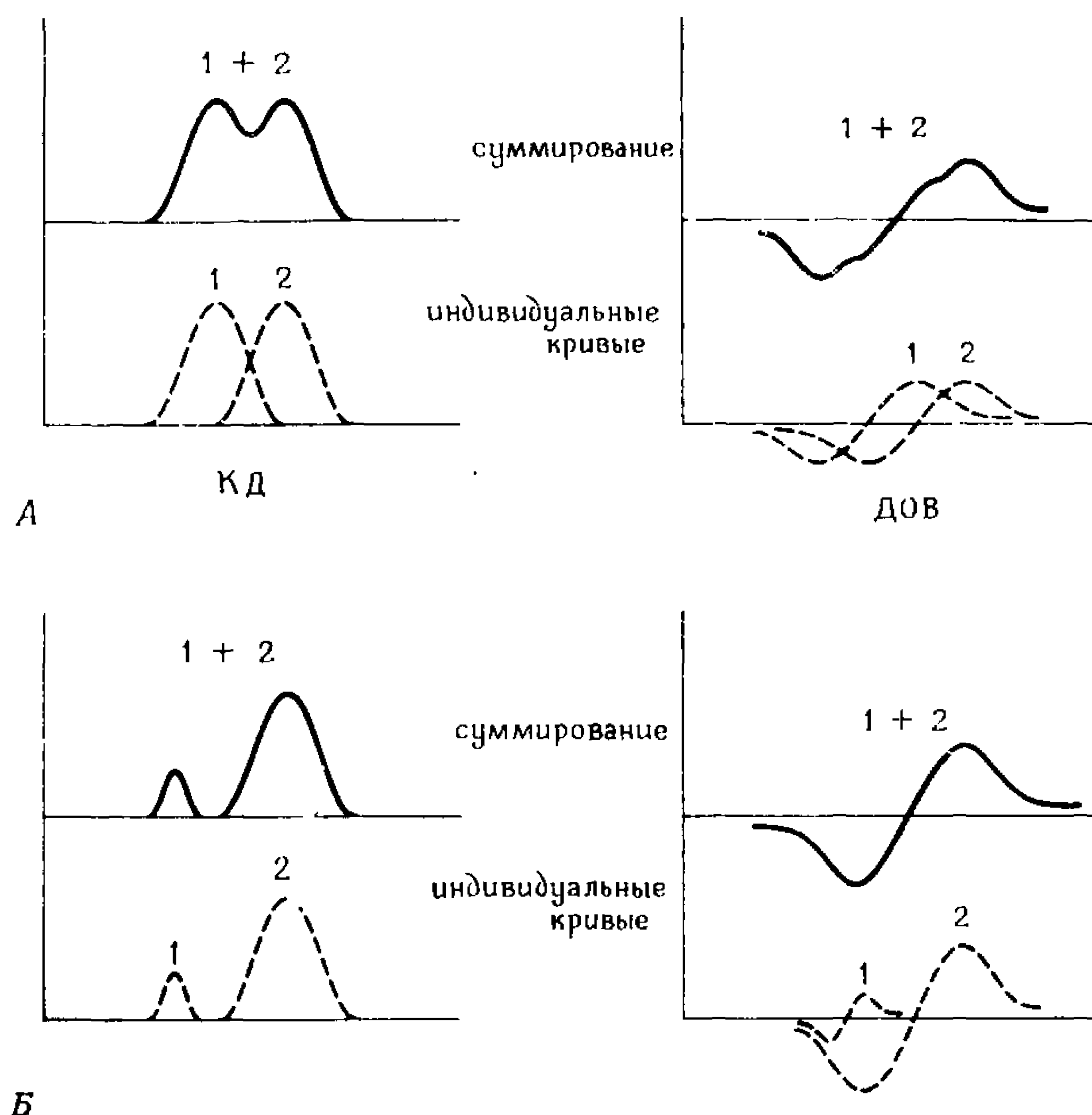


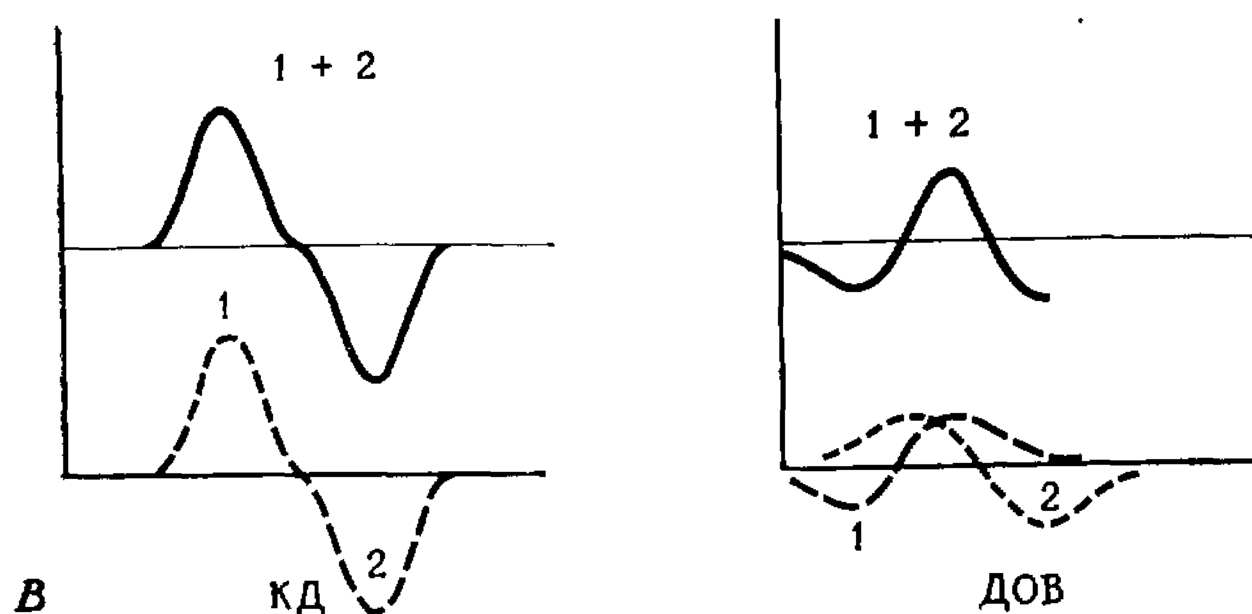
РИС. **16-7.**

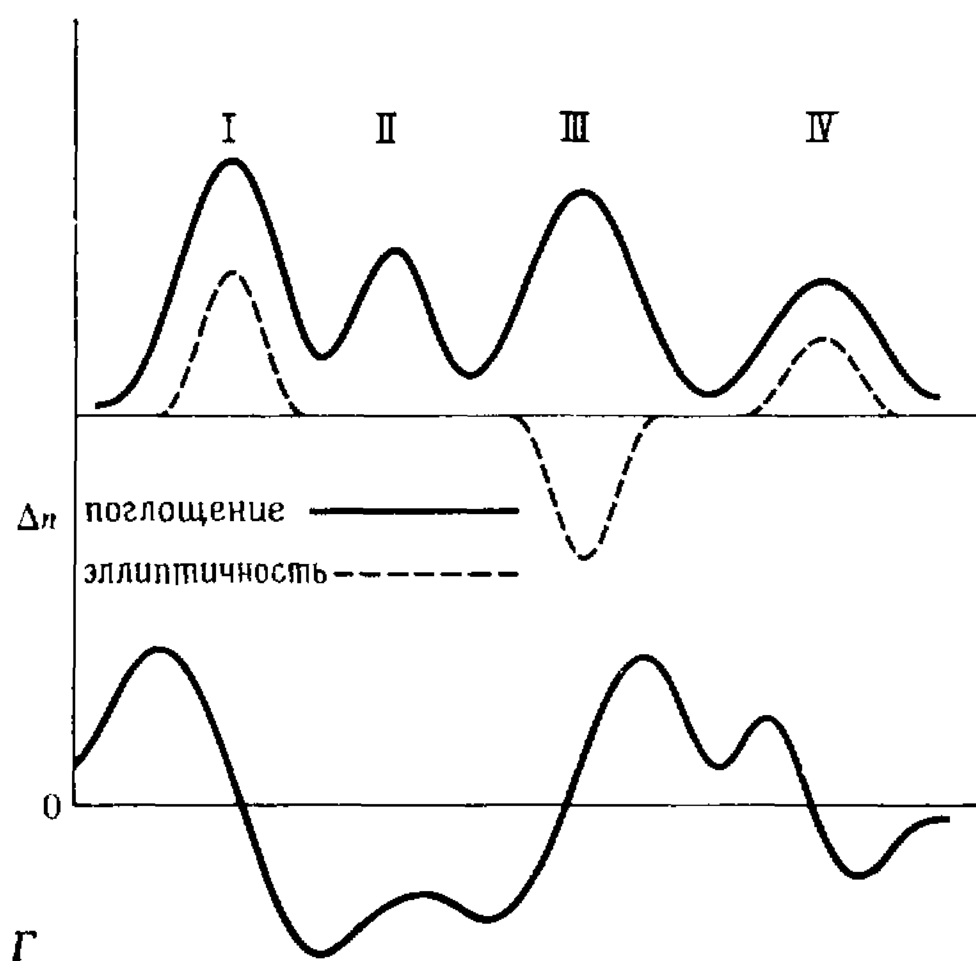
Сравнение возможностей методов ДОВ и КД для обнаружения двух оптически активных полос. В каждом случае сплошная верхняя кривая является суммой двух нижних штриховых кривых.

А — обе кривые имеют одинаковый знак и амплитуду, но различные $\lambda_{макс}$; *Б* — амплитуды отличаются; *В* — знаки отличаются, но амплитуды почти одинаковые; *Г* — проводится сравнение спектра поглощения (верхняя сплошная линия), КД (штриховая линия) и ДОВ (нижняя сплошная линия) для системы, содержащей четыре полосы. Отметим, что по кривым КД можно заключить, какие полосы являются оптически активными и определить их знак.

на спектре КД, для которого характерны узкие полосы, обе полосы проявляются совершенно отчетливо. На рис. 16-7, *В* виден результат наложения кривых с положительным и отрицательным эффектами. Эти примеры призваны убедить читателя в том, что разрешение на спектрах КД превосходит разрешение в случае ДОВ.

Используя данные второй схемы (рис. 16-7, *Г*), можно добавить к этому заключению, что анализ КД дает более ценную информацию, чем простая абсорбционная спектроскопия в неполяризованном свете. Отметим, что спектр поглощения просто указывает, что система состоит из четырех хромофоров (т. е. что имеются четыре полосы), в то время как из спектра КД следует, что три из четырех хромофоров (I, III и IV) связаны с оптически активными центрами. Знак КД, кроме того, свидетельствует о хи-





ральности хромофора. Можно также видеть, что ДОВ вследствие наложения плавных участков кривых с эффектом Коттона для полос I и III не дает четкого доказательства, является ли полоса II оптически активной.

В некоторых примерах этой главы приведены экспериментальные данные, включающие измерения ДОВ, так как несмотря на сложность спектров, многие важные результаты были получены именно этим методом. Однако, читая современную научную литературу, можно видеть, что в настоящее время чаще используют метод КД.

Аппаратура для измерения ДОВ и КД

Измерения ДОВ и КД обычно проводят в растворах, хотя изредка используют пленки и твердые вещества. Раствор помещают в кювету. Основное техническое оснащение состоит из источника света с набором длин волн, системы для поляризации света, системы для измерения поляризации после того, как свет пройдет через кювету, и детектора, с помощью которого может быть измерен световой поток.

На рис. 16-8 показана упрощенная схема прибора для измерения ДОВ. Источник света и монохроматор позволяют получать излучение с определенной длиной волны. Этот свет проходит через поляризатор, который дает плоскополяризованный свет. Для определения угла поляризации используют анализатор (который фактически является просто еще одним поляризатором). Когда плоскость анализатора параллельна плоскости поляризатора, свет проходит без ослабления. Прошедший свет за-

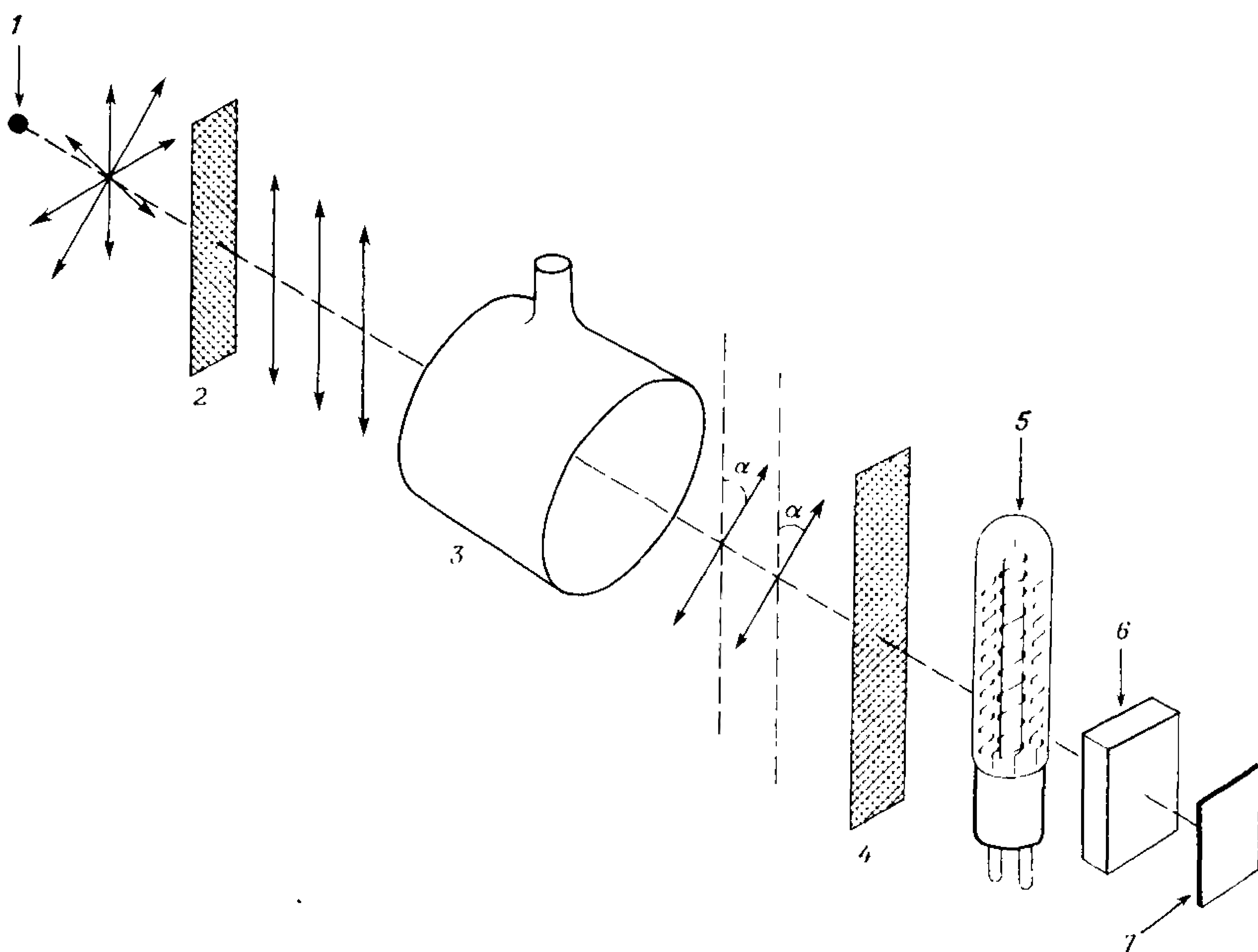


РИС. **16-8.**

Схема прибора для измерения ДОВ.

1 — источник света; *2* — поляризатор; *3* — кювета образца; *4* — анализатор; *5* — фотоумножитель; *6* — электронное оборудование; *7* — самописец.

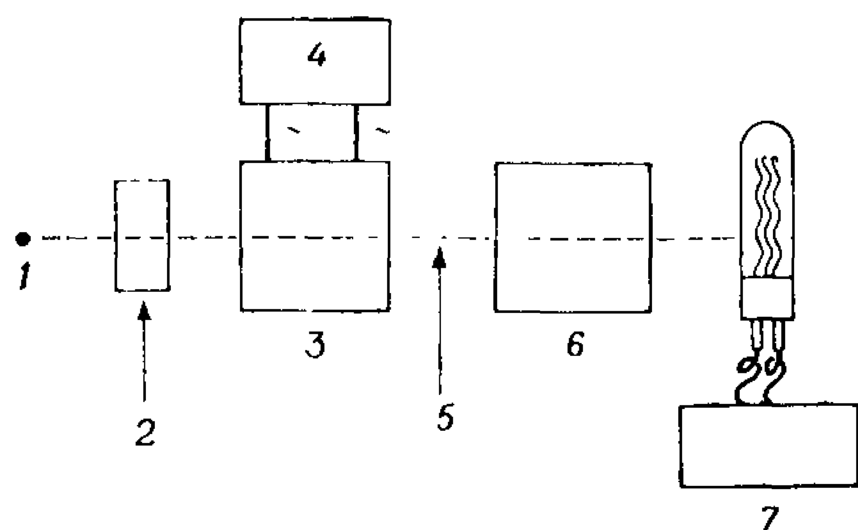


РИС. 16-9.

Схема прибора для измерения КД.

1 — источник света; 2 — поляризатор; 3 — кристалл; 4 — модулятор; 5 — свет с изменяющейся круговой поляризацией; 6 — образец; 7 — электронное оборудование.

тем падает на фотоумножитель, который превращает свет в электрический ток. Если в кювете находится образец, который вращает плоскость поляризации света, для максимального прохождения света анализатор нужно повернуть *. Угол, при котором достигается прохождение максимальной интенсивности света, определяется как наблюдаемое вращение α [см. уравнение (1)]. На практике в современных автоматических приборах одновременно меняется длина волны, определяется вращение и вычерчивается зависимость α_λ от λ. В различных коммерческих приборах это делается несколько по-разному, но принцип такой, как описано выше.

Для измерения КД в принципе нужны два когерентных источника света, один для L- и другой для R-поляризованных по кругу лучей света, причем каждый должен быть снабжен монохроматором для выделения длин волн. Однако в коммерческих приборах (рис. 16-9) используется простой прием для получения L- и R-лучей света от одного источника. Плоскополяризованный свет проходит через кристалл, к которому приложено переменное электрическое поле. Этот кристалл (называемый электрооптическим модулятором) обладает замечательным свойством: в зависимости от полярности поля он пропускает L- или R-компонент света. Так как поле — это переменный ток, луч постоянно модулируется, давая то L-, то R-свет. Этот луч затем проходит через кювету с образцом и падает на фотоумножитель. Выходной сигнал фотоумножителя преобразуется довольно сложным путем с помощью электронного оборудования, давая напряжение, пропорциональное эллиптичности, которое автоматически вычерчивается в виде функции длины волны. Так получают спектр КД.

* Обычно образец помещается между скрещенными поляризатором и анализатором и анализатор поворачивается до полного *гашения* света. — *Прим. ред.*

Интерпретация кривых ДОВ и КД

Теория оптической активности пока еще не позволяет установить точную структуру белка по спектру КД, хотя, как будет видно позже, в случае нуклеиновых кислот дело обстоит несколько лучше. Осложнения возникают из-за того, что очень часто хромофор не является асимметричным, а его асимметрично возмущают соседние группы. Кроме того, в случае белков (когда спектры КД регистрируют в области поглощения пептидных связей) имеется осложнение другого рода: так как полипептидная цепь принимает многие конформации, зависящие от точной локализации пептидных связей в белке, спектр соответствует усредненным конформационным параметрам. Поэтому на практике используется эмпирический подход, заключающийся в том, что получают спектр ДОВ или КД молекул, структура которых точно определена методом рентгеноструктурного анализа, и устанавливают связь спектра со структурой молекулы. Этот спектр затем сравнивают со спектром белка, структура которого неизвестна. Главная проблема, которая возникает при использовании этого подхода, состоит в необходимости сделать допущение (которое редко доказывается), что структура макромолекулы в растворе (известно, что ДОВ и КД регистрируют в растворе) почти такая же, как в пленке, кристалле или сухом порошке (которые используют для рентгеноструктурного анализа), приготовленных с использованием того же растворителя.

Для разрешения таких проблем был разработан ряд рабочих «правил», используемых для анализа спектров. Некоторые из этих правил представлены в табл. 16-1. Правило *1* в первую очередь используется для оценки преобладающей конформации

ТАБЛИЦА 16.1

Эмпирические правила, применяемые для интерпретации спектров ДОВ и КД

1. Спектр ДОВ или КД аддитивен, т. е. представляет собой простую сумму спектров компонентов (как на рис. 16-7). Это заключение не всегда строго соблюдается, но может служить в качестве хорошего приближения.

2. Амплитуда кривой ДОВ или сила вращения, определяемая по кривой КД, в некоторых случаях являются мерой степени асимметрии молекулы. Если эти параметры увеличиваются или уменьшаются под действием некоторого агента, значит, он увеличивает или уменьшает асимметрию молекулы (хотя изменение асимметрии обычно затрагивает и другие спектральные параметры).

3. Симметричный хромофор может стать оптически активным, когда он попадает в асимметричное окружение (например, спираль). Это может сопровождаться или не сопровождаться изменением λ_0.

4. Величина λ_0 и величина и знак $\Delta\varepsilon$ при λ_0 позволяют идентифицировать хромофор, потому что эта величина λ_0 всегда близка к величине λ_0, полученной из обычного спектра поглощения.

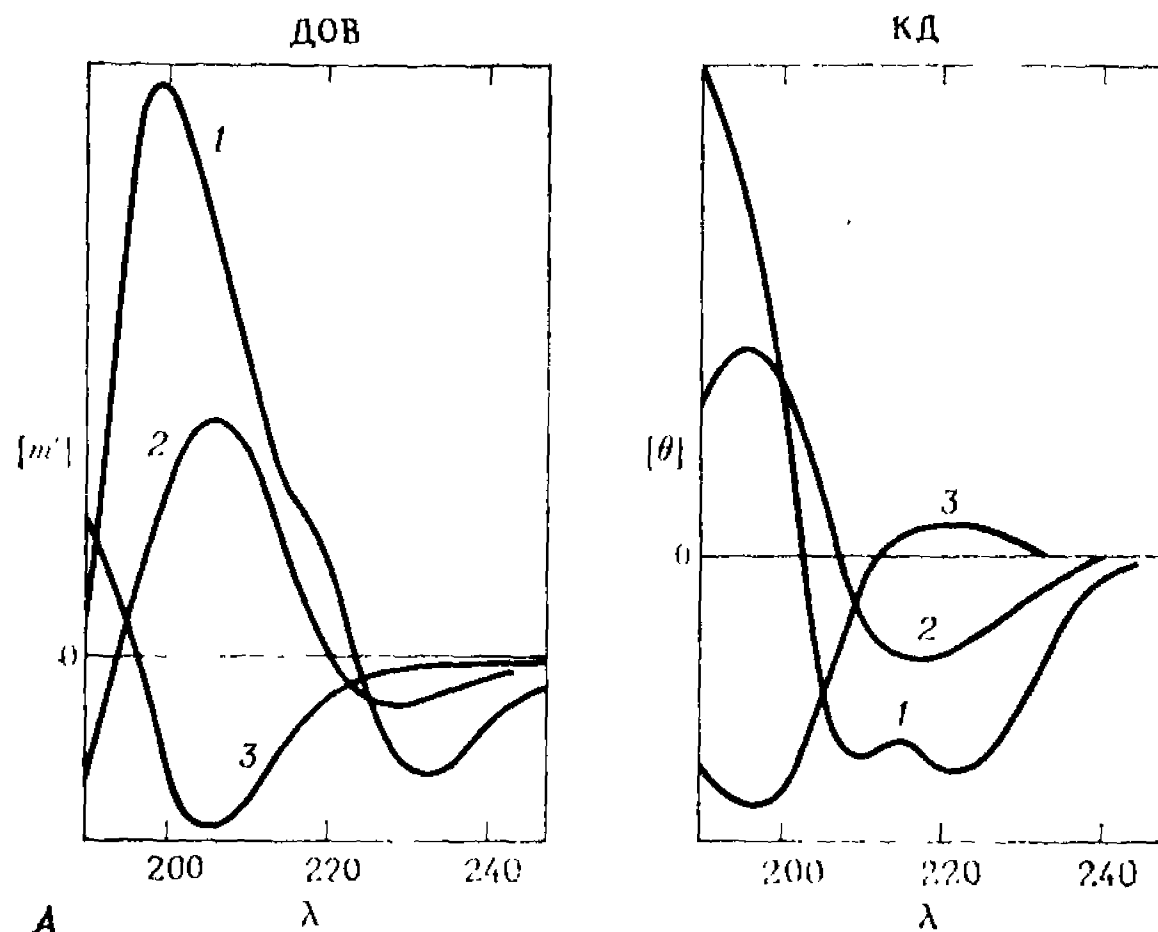
макромолекулы (например, для определения содержания в белке спиральной конформации), или оно может быть использовано для подтверждения того, что структура, определенная с помощью рентгеноструктурного анализа, сохраняется в растворе. Правила *2* и *3* главным образом используются для исследования взаимодействий между макромолекулами и малыми молекулами. Примеры, приведенные ниже в этой главе, иллюстрируют применение правил.

Применение ДОВ и КД для изучения структуры белков и полипептидов

Из-за отсутствия соответствующей теории, как уже обсуждалось ранее, для установления вторичной структуры белка разработан эмпирический подход, согласно которому определяют кривые ДОВ и КД для модельных полипептидов. (Для модельного полипептида характерна только одна конформация и его структура известна из данных по рассеянию рентгеновских лучей.) Затем пытаются из этих «стандартных» кривых построить средневесовую кривую, которая была бы такой же, как наблюдаемая кривая образца.

Для белков главными стандартами являются три формы поли-L-лизина: α-спираль, β-форма и беспорядочный клубок, спектры ДОВ и КД которых показаны на рис. 16-10, *А*. Если допустить, что не существует других конформаций и что боковые цепи аминокислот не оказывают влияния на спектры, тогда путем простого графического сложения можно рассчитать ожидаемую кривую для белка, содержащего смесь этих трех конформаций. Пример показан на рис. 16-10, *Б*, где изображены наблюдаемая и рассчитанная кривая КД миоглобина (структура которого точно известна из данных рентгеноструктурного анализа). Как можно видеть, анализ является достаточно хорошим, хотя и нет полного совпадения. Такое графическое сложение просто выполнить для расчета кривой белка *с известной структурой*. Однако более интересная проблема — определение вклада трех форм в случае белка с неизвестной структурой — является серьезной задачей, которая решается путем подбора кривых с помощью ЭВМ. Для этого осуществляют непрерывную подгонку, изменяя долю каждой кривой, и проводят суммирование, пока не будет получена наблюдаемая кривая.

Трудность такого анализа состоит в том, что, как отмечалось для миоглобина, редко наблюдается полное совпадение с рассчитанной кривой. Как и следовало ожидать, это обусловлено



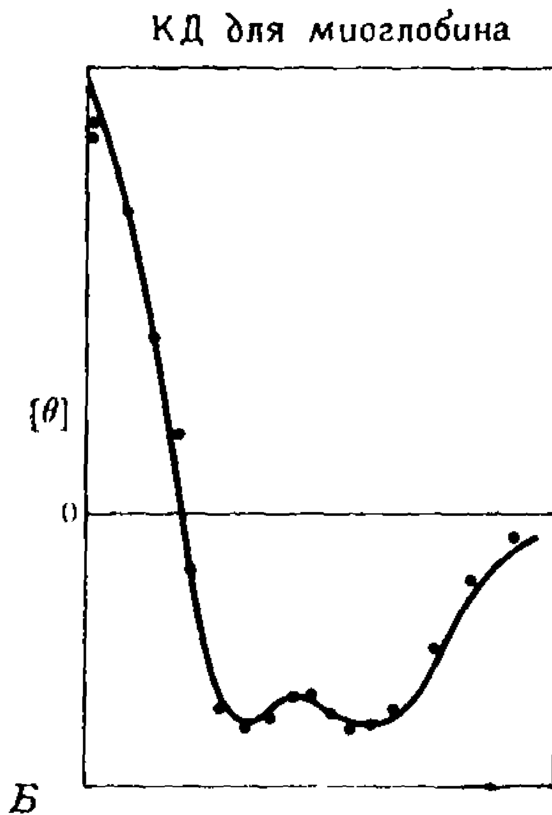


РИС. **16-10.**

А — спектры ДОВ и КД поли-L-лизина в конформациях α-спирали (*1*), β-структуры (*2*) или беспорядочного клубка (*3*). *Б* — наблюдаемая кривая КД миоглобина и кривая, рассчитанная (···) из данных для поли-L-лизина, приведенных в части А (68,3% α, 4,7% β и 27,0% беспорядочного клубка). [*Greenfield N., Fasman G.*, Biochemistry, 8, 4108—4115 (1969.]

нарушением допущения, сформулированного в предыдущем параграфе. Дело в том, что на спектры оказывают влияние присутствующие ароматические боковые группы, дисульфидные мостики и простетические группы, а также длина цепи и отличные от α-, β- и беспорядочного клубка * конформации пептидной связи (например, описанные в гл. 1 различные типы β-изгибов). К пониманию этого привели следующие наблюдения:

* Возможен также случай, что ни один участок нативного белка не принимает настоящей формы беспорядочного клубка из-за множества слабых взаимодействий между боковыми цепями и из-за того, что короткие участки пептидной цепи, соединенные регулярными участками, никогда не могут быть полностью гибкими, так как их концы не могут двигаться совершенно свободно.

1. Не все спектры белков, претендующих на «истинное» α-спиральное строение, одинаковы; это вызвано небольшим влиянием неароматических боковых групп на силу вращения пептидной связи и происходящему время от времени искажению α-спирали вследствие образования водородной связи между двумя аминокислотами, разделенными *одной* аминокислотой, а не тремя (как в структуре α-спирали).

2. Сила вращения, приходящаяся на остаток, в случае длинных гомополипептидов не такая, как в случае коротких. В этом состоит трудность, так как α-спиральные участки белков содержат от трех до двадцати аминокислот; все же модельные соединения, имеющие α-спиральную структуру, характеризуются очень большой длиной.

3. «Стандарты» для беспорядочного клубка, возможно, не полностью имеют форму беспорядочного клубка. Также обстоит дело и с сегментами беспорядочного клубка в белках, в которых, возможно, содержатся β-изгибы.

4. Методом рентгеноструктурного анализа в белках найдены структуры, которые неизвестны для синтетических полипептидов, используемых в качестве модельных соединений.

5. Некоторые конформации боковых цепей фенилаланина, тирозина, гистидина и триптофана могут вносить вклад в спектры КД. Полимеры, образованные этими аминокислотами, дают спектры, отличные от спектров полипептидов, состоящих из неароматических аминокислот.

6. Пролин и глицин могут образовывать левоспиральные структуры, как в случае коллагена.

7. Дисульфидные мостики цистина, как в случае инсулина и рибонуклеазы, дают полосы КД, которые не могут быть связаны с поглощением пептидной группы.

8. Небелковые простетические группы (например, гем в гемоглобине) оказывают влияние на спектры.

К этому времени читатель, конечно, решил, что коль скоро речь идет об определении структуры белка, лучше обойтись без методов ДОВ и КД. Однако, как видно из рис. 16-10, *Б*, эти методы иногда полезны. Действительно, как показано в табл. 16-2, методы ДОВ и КД могут применяться для общего описания содержания спиральных структур в белках. Кроме того, в результате недавних исследований спектров КД внесена ясность в некоторые проблемы и получена информация, облегчающая интерпретацию особенностей спектров. Важно представлять себе, что экспериментатор не всегда может откладывать экспериментирование до тех пор, пока будут доступны данные рентгеноструктурного анализа, и информация, извлеченная из исследований спектров КД в сочетании с данными других методов, таких, как флуоресценция, ядерный магнитный резонанс и седиментация,

ТАБЛИЦА 16-2

Сравнение[a] результатов методов КД и рентгеноструктурного анализа по определению содержания спиральных структур в белках

Белок	Содержание α-спиральных структур, %	
	КД	рентгеноструктурный анализ
Миоглобин	77	77
Лизоцим	29	29
Рибонуклеаза	18	19
Папаин	21	21
Лактатдегидрогеназа	31	29
α-Химотрипсин	8	9
Химотрипсиноген	9	6

Данные из работы *Chen Y. H.*, *Yang J. T.*, *Martinez H. M.*, Biochemistry, **11**, 4120—4131 (1972).

Примечание. В случае аналогичных данных для β-структуры наблюдается худшее совпадение, так как с помощью КД не всегда удается точно обнаружить различные типы β-изгибов.

[a] Сравнение правомерно только в случае α-химотрипсина и α-химотрипсиногена. При обработке данных КД для остальных белков использовались величины содержания α-спирали, определяемые для них методом рентгеноструктурного анализа. — *Прим. ред.*

часто приводит к приемлемому описанию конформации макромолекулы.

Из материала следующего раздела очевидно, что другим важным применением ДОВ и КД в случае белков является исследование конформационных *изменений*, к которым эти методы чрезвычайно чувствительны.

Изучение конформационных изменений методом КД

Хотя метод КД редко дает полную информацию о структуре и всегда необходимо проводить сравнение со стандартами, структура которых определена методом рентгеноструктурного анализа, КД чрезвычайно чувствителен к *изменениям* конформаций — если каким бы то ни было образом меняется конформация, должно произойти изменение спектра КД. Следовательно, даже если структура совсем не известна и кривая КД фактически не поддается интерпретации, КД тем не менее остается чувствительным методом обнаружения любых взаимодействий и агентов, вызывающих конформационную перестройку. Это можно сделать полуколичественно, рассматривая, как изменяются раз-

личные характеристики спектра. Следовательно, можно задумывать опыты, в которых изменение КД будет служить переменной. Как это делается, лучше рассмотреть на примере.

Пример 16-А. *Изменения структуры фермента, вызванные веществами, которые с ним связываются.* Спектры КД многих ферментов меняются, когда фермент взаимодействует с субстратом, коферментом или ингибитором. Это можно использовать для исследования процесса связывания. Например, измеряя силу вращения в зависимости от концентрации связанных молекул, можно определить константы связывания. Так как каждая связанная молекула изменяет R на определенную величину, из величины суммарного изменения можно определить число связанных молекул. В тех случаях, когда изменения КД малы, их можно усилить, вводя в активный центр или недалеко от него оптически активный хромофор или хромофор, который становится оптически активным при связывании с белком, и изучая затем изменения КД этого хромофора. Таким путем можно, кроме того, идентифицировать активные центры; для этого в различные участки белка вводят хромофор и определяют, в каком участке связывание субстрата оказывает влияние на КД. Методика во многом похожа на метод репортерных групп, применяемый в абсорбционной спектроскопии (гл. 14). Можно предположить следующую ситуацию. В белке имеется 4 гистидина и один из них находится в активном центре. Вводя хромофор (часто с трудом) по соседству с одним из гистидинов, исследуют КД хромофора до и после связывания субстрата. Если нет влияния на спектры КД хромофора, находящегося по соседству с гистидинами 1, 2 и 4, но есть в случае гистидина 3, это может свидетельствовать о присутствии гистидина 3 в активном центре. Отметим, однако, что эти эффекты экспериментально трудно уловить.

Пример 16-Б. *Денатурация белка.* Денатурация белков всегда сопровождается изменениями КД, которые означают, что происходят потеря α-спирали и β-структуры и увеличивается вклад в спектр от форм, соответствующих беспорядочному клубку. Следовательно, можно проследить за денатурацией, откладывая зависимость эллиптичности при определенной длине волны от условий денатурации. На рис. 16-11 приведен пример денатурации миоглобина под действием изменяющегося pH.

Пример 16-В. *Изучение образования пространственной структуры белков.* Большой интерес представляют силы, участвующие в формировании пространственной структуры белка. Этот процесс обычно изучался путем рассмотрения переходов спираль — клубок. Метод КД открывает новые возможности в этих исследованиях, потому что, если известна последовательность аминокислот, можно непосредственно рассматривать окру-

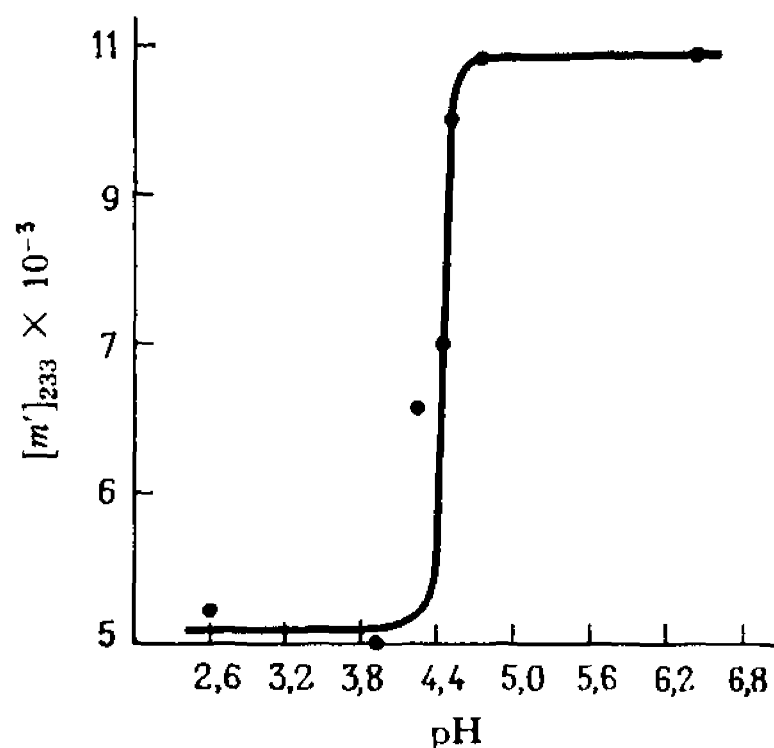


РИС. **16-11.**

Обнаружение денатурации миоглобина при титровании кислотой путем измерения молярного вращения при 233 нм. [Из работы *Appel P., Brown W. D.*, Biopolymers, **10**, 2309—2322 (1971).]

жение ароматических аминокислот и дисульфидных связей, имеющих полосы КД при характерных длинах волн. Отсюда в принципе появляется возможность обнаружить по соседству с определенными аминокислотами изменения, вызванные разрушением гидрофобных сил или водородных связей, титрованием отдельных аминокислот и т. п. В качестве примера рассмотрим поведение тирозина в панкреатической рибонуклеазе. Этот остаток расположен далеко от активного центра фермента, но его КД меняется при добавлении ингибитора — 3′-цитидиловой кислоты, которая связывается с активным центром. Таким образом, связывание с одним участком белка может приводить к конформационной перестройке в удаленной части молекулы.

Измерение ДОВ и КД в случае полинуклеотидов, нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов

Оптически активными группами, которые наблюдают при исследовании всех полимеров, содержащих нуклеотиды, являются пурины и пиримидины, так как связи в сахарах и фосфоэфирные связи не поглощают в обычно изучаемом диапазоне длин волн. Сами по себе пурины и пиримидины являются примерами симметричных хромофоров, которые становятся оптически активными в результате присоединения к сахару посредством N-гликозидной связи; кроме того, их оптическая активность существенно возрастает при образовании спиральных структур.

ДОВ и КД чрезвычайно чувствительны к конформационным изменениям полинуклеотидов. Так, например, в течение многих лет наиболее обычным путем анализа конформационных измене-

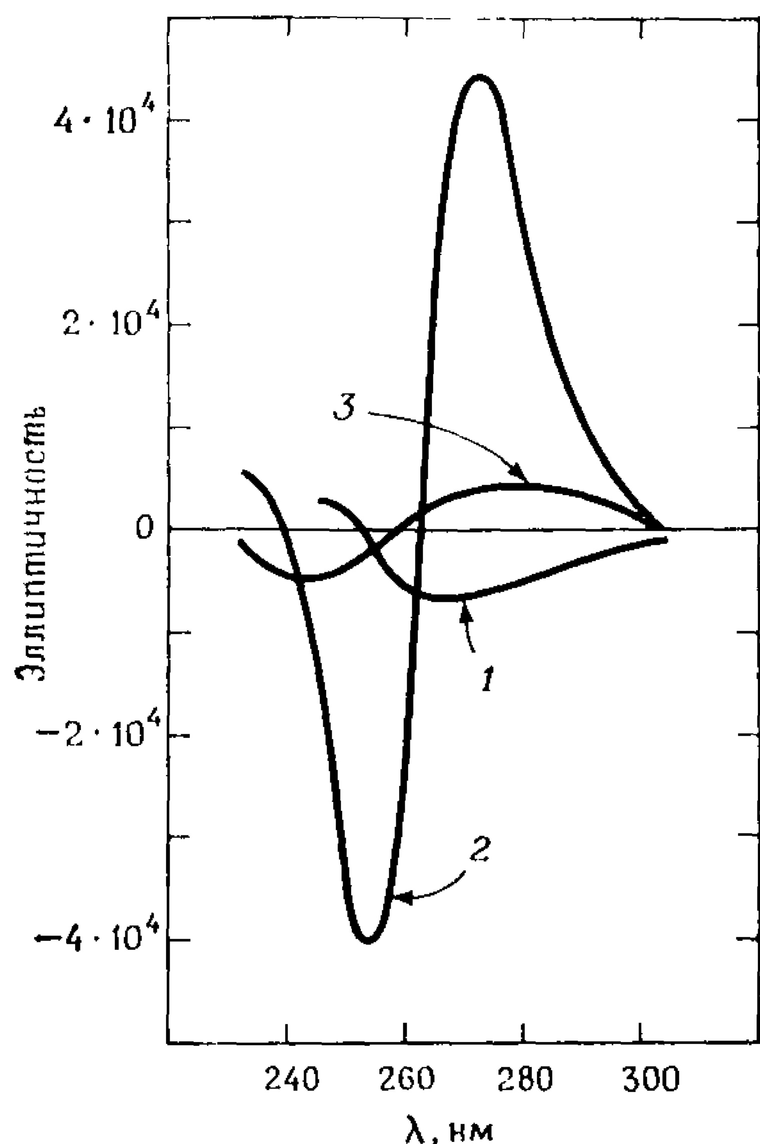


РИС. 16-12.

Спектры КД адениловой кислоты (*1*), полиадениловой кислоты [poly(A)] (*2*) и денатурированной poly (А) (*3*). Отметим изменение знака эффекта Коттона при полимеризации адениловой кислоты и значительное увеличение эллиптичности в случае неденатурированной структуры.

ний полинуклеотидов было изучение гипохромии — уменьшения оптической плотности, сопровождающее образование упорядоченной структуры (см. гл. 14). Оптическая плотность полиадениловой кислоты, poly (А), при 258 нм на 26% меньше, чем плотность мономера — адениловой кислоты. Отличие КД для тех же веществ показано на рис. 16-12. Обратим внимание на инверсию знака эффекта Коттона и увеличение θ. Ясно, что эти изменения намного превышают те, что наблюдаются при изучении поглощения. Изменения θ такого рода можно использовать для исследования: 1) разрушения спиральной структуры полинуклеотидов под действием различных агентов, таких, как высокая температура или экстремальные значения pH (отметим видные на рис. 16-12 большие изменения спектра КД poly (А) при денатурации); 2) перехода одноцепочечных полинуклеотидов в двухцепочечные и наоборот; 3) структурных изменений полинуклеотидных цепей под влиянием связывания катионов, пептидов, белков и т. п. и 4) эффекта «нагружения» тРНК аминокислотой.

Для одноцепочечных полинуклеотидов существует приемлемая теория (теория Игнацио Тиноко), связывающая спектры ДОВ и КД со структурой. Недавно эта теория была подтверждена во всех деталях, и в настоящее время она позволяет вычислить с некоторой степенью точности спектр КД исходя из молекулярной структуры. Наиболее важный элемент этой теории заключается в том, что оптическая активность олигонуклеотидов есть ре-

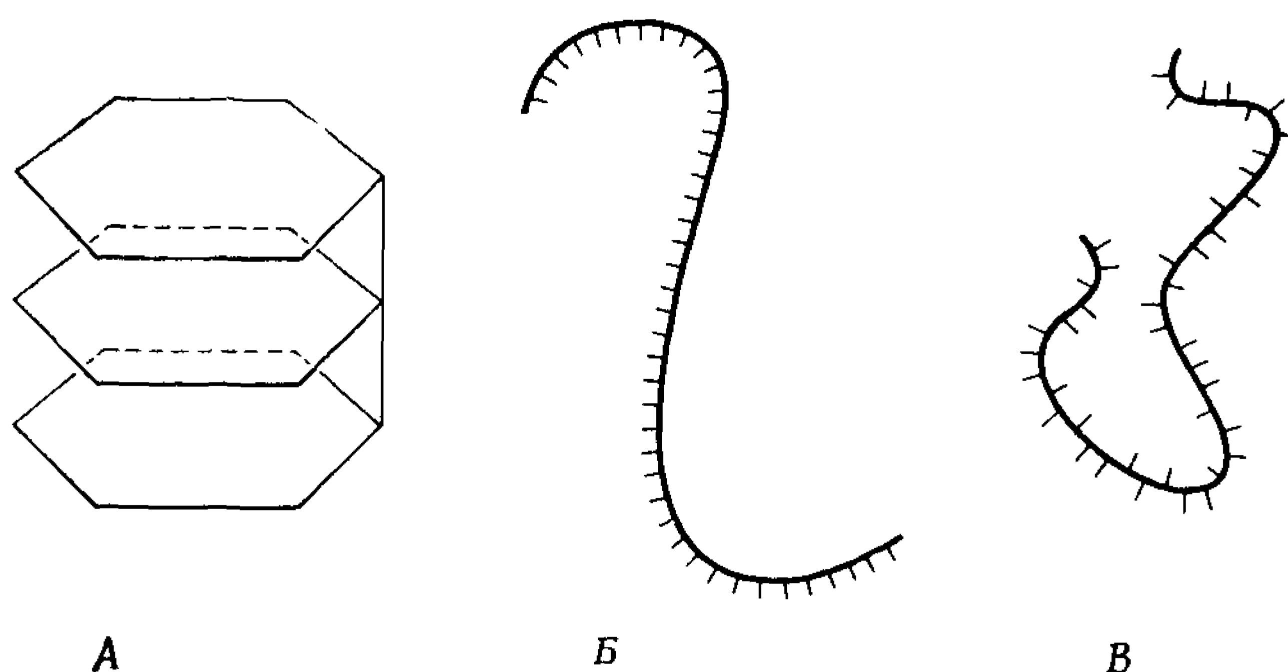


РИС. 16-13.

Три основания в стэкинг-конформации (*А*); структура полинуклеотидов, имеющих стэкинг-конформацию (*Б*) и не имеющих ее (*В*). Полинуклеотиды в стэкинг-конформации являются более протяженными, так как вследствие стэкинг-взаимодействий оснований уменьшается гибкость молекулы.

зультат взаимодействия двух *соседних оснований* — *ближайших соседей,* — которые *уложены в стопку* друг над другом (рис. 16-13). Взаимодействие следующих оснований (т. е. оснований, разделенных ближайшим соседом каждого) не вносит существенного вклада. Зная спектры КД всех пар ближайших соседних оснований (т. е. спектры динуклеозидфосфатов) и частоту ближайших соседей, можно путем простого суммирования рассчитать спектр КД одноцепочечного полинуклеотида. Если бы можно было с помощью вычислительной техники из спектра КД определить частоту ближайших соседей, это представляло бы огромную практическую ценность при определении последовательности оснований. Точность анализа методом КД не превышает обычные ферментативные методы, но для получения спектра КД требуется несколько часов, а для выполнения ферментативного анализа — около недели при наличии очищенных ферментов. Для двухцепочечных полинуклеотидов разработка теории еще не завершена, хотя прогресс идет быстрыми темпами. Для двухцепочечных ДНК в обычно рассматриваемой области длин волн спектры КД, по-видимому, не зависят от состава оснований, хотя по недавно полученным данным в далеком (вакуумном) ультрафиолете такая зависимость возможна.

Примеры использования методов ДОВ и КД для изучения структуры полинуклеотидов

Рассмотрим несколько примеров использования ДОВ и КД для определения структурных особенностей полинуклеотидов.

Пример 16-Г. *Структура полицитидиловой кислоты — poly(C).* Из спектров ДОВ poly(C) можно определить, что $[m']_{292}=35160$; согласно правилам *2* и *3* (табл. 16-1) это означает, что poly(C) имеет очень асимметричную структуру, которая в случае полинуклеотидов представляет собой спираль. С помощью спектрального анализа легко установить, какие силы способствуют формированию спирали. Например, при добавлении формальдегида, который оксиметилирует аминогруппы и таким образом препятствует образованию водородных связей, $[m']_{292}$ практически не меняется. Следовательно, спираль стабилизируется не водородными связями. Однако в 90%-ном этиленгликоле — реагенте, который, как известно, мешает взаимодействию неполярных (гидрофобных) групп, $[m']_{292}=7223$, т. е. в пять раз меньше, это значит, что асимметрия (т. е. спиральность) резко понизилась. $[m']_{292}$ мономера, цитидиловой кислоты, составляет, как в H_2O, так и в 90%-ном этиленгликоле примерно 8000. Следовательно, структура полимера стабилизируется так называемыми гидрофобными силами. Стабилизация гидрофобными силами означает, что взаимодействующие молекулы проявляют тенденцию располагаться так близко, чтобы между ними не было молекул воды; таким образом, этот результат дает возможность предположить, что основания в poly(C) расположены одно над другим и что они находятся относительно близко, т. е. имеет место стэкинг-конформация (рис. 16-13, *Б*).

Предположим, что эффект рассмотренных выше реагентов был изучен не методом ДОВ, а путем простого определения изменений поглощения. При добавлении формальдегида D_{260} возрастает примерно на 10%, но причиной этого могла явиться как потеря спиральности, так и изменение поглощения самого цитозина (поскольку титрование формальдегидом свободных оснований приводит к возрастанию поглощения). Следовательно, никакого заключения о роли водородных связей не может быть сделано. Возрастание D_{260} при добавлении этиленгликоля (слабополярного растворителя) составляет 30%. Это дает возможность предположить наличие гидрофобных взаимодействий, но без данных ДОВ нельзя доказать, что реагент оказывает воздействие на спиральность.

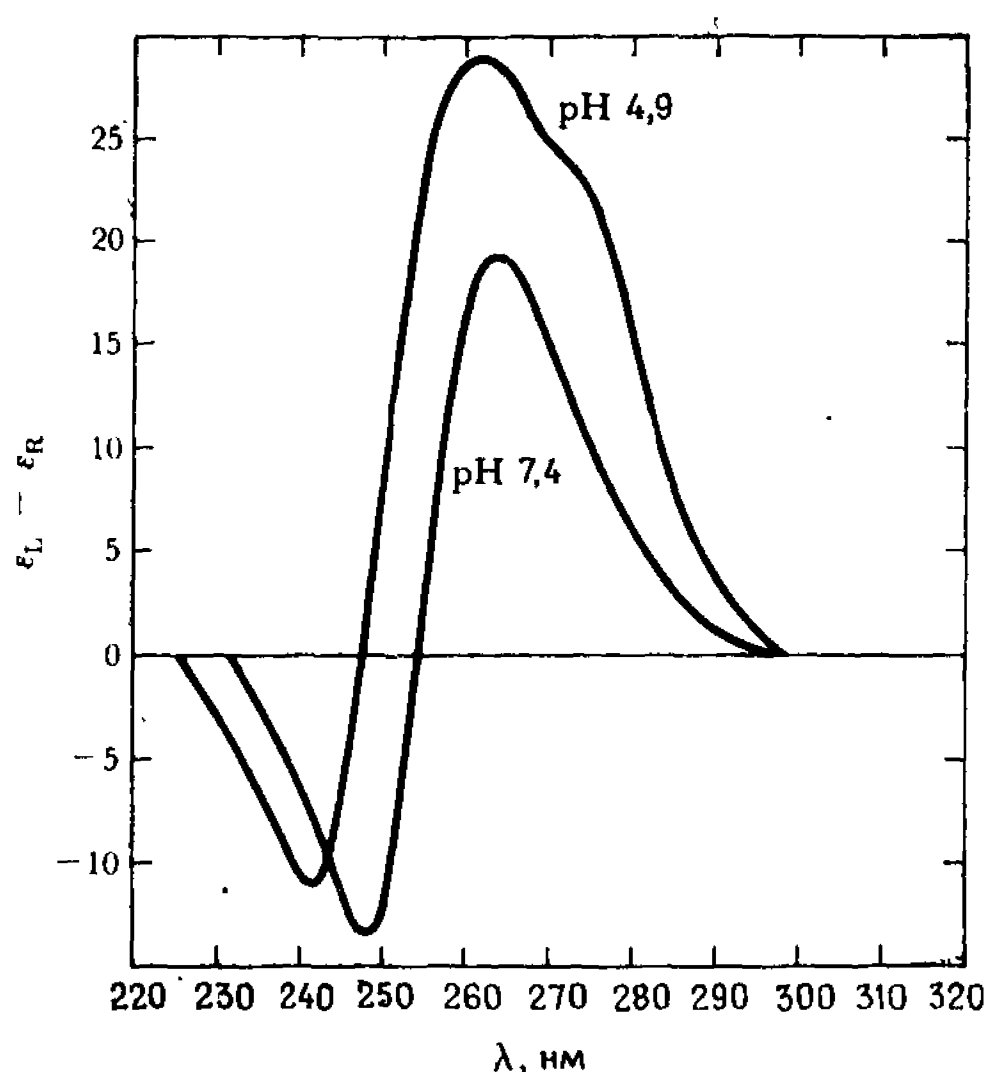


РИС. 16-14.

Спектр КД poly(A) при кислых и нейтральных значениях pH. [Из работы *Brahms J.*, Nature, **202**, 797—798 (1964).]

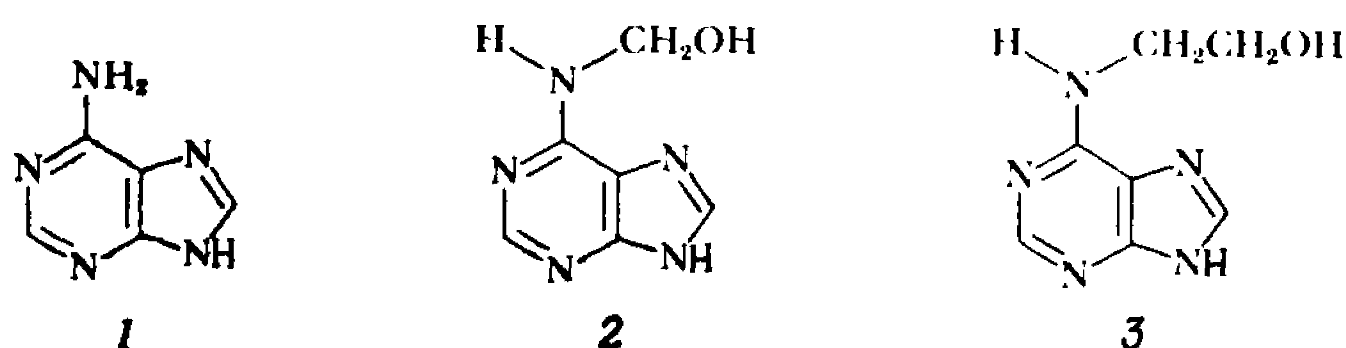


РИС. 16-15.

Химическая структура аденина (*1*), аденина, прореагировавшего с формальдегидом (N^6-оксиметиладенина) (*2*), и N^6-оксиэтиладенина (*3*). При формилировании блокируется NH_2-группа аденина, которая участвует в образовании водородной связи. Эта группа уже блокирована в N^6-оксиэтиладенине.

Пример 16-Д. *Строгое доказательство стэкинг-взаимодействий оснований.* Для ди- и тринуклеозидфосфатов характерны *значительные*, по сравнению с мономерами, амплитуды эффектов Коттона на кривых ДОВ и КД, т. е. даже короткие олигомеры имеют очень асимметричную, возможно, спиральную конформацию. В органических растворителях сила вращения значительно понижается, так что в водных растворах должна существовать спиральная структура, стабилизированная гидрофобными силами, как в примере 16-Г. Основу для понимания этих данных дает теория Тиноко, потому что спектры КД динуклеотидов почти точно совпадают со спектрами, рассчитанными с учетом стэкинг-конформации оснований. Из величин [M] и [θ] можно определять долю оснований, которые при различных условиях образуют стэкинг-конформацию.

Оптическая активность олигонуклеотидов, содержащих урацил, невелика или вообще отсутствует; следовательно, стэкинг-взаимодействия между остатками урацила очень сильно ослаблены.

Исследования стэкинг-взаимодействий подтвердили и фактически доказали ранее высказанную гипотезу о том, что основными силами, стабилизирующими двухцепочечную структуру ДНК, являются гидрофобные силы. Путем многочисленных исследований гиперхромии и измерений вязкости в растворах различной полярности было показано, что при уменьшении полярности двухцепочечная ДНК теряет свою жесткость. С помощью ДОВ и КД было доказано, что изменения поглощения были обусловлены изменениями спиральности.

Пример 16-Е. *Структура различных форм полиадениловой кислоты — poly(A).* При нейтральных значениях pH для одноцепочечной poly(A) наблюдаются очень интенсивные полосы КД, свидетельствующие о высокоупорядоченной структуре (рис. 16-14). Возможно, она представляет собой спираль из двух цепей, которые удерживаются вместе за счет водородных связей между 6-аминогруппой остатка аденина и OH-группой рибозы, расположенной в находящейся рядом цепи. Однако для поли-N^6-оксиэтиладенина, который не может образовывать водородные связи (рис. 16-15), наблюдается похожий спектр КД, отсюда маловероятно, что в структуре имеются водородные связи и что она является двойной спиралью. Так как КД динуклеотида совпадает с КД, предсказанным для этого типа соединений при наличии стэкинг-взаимодействий оснований, и так как с увеличением числа A (до 7 или 8) в oligo(A) сила вращения полосы КД возрастает, poly(A) при нейтральных pH, возможно, представляет собой протяженную полужесткую спиральную молекулу, структура которой стабилизирована за счет стэкинг-взаимодействий оснований.

При кислых pH сила вращения (площадь) полосы КД в полтора раза больше, чем при нейтральных pH (рис. 16-14), что свидетельствует о большей асимметрии при кислых pH. Кроме того, λ_0 полосы КД сдвинута по сравнению с λ_0 при нейтральных pH в область более коротких длин волн и приближается к $\lambda_{макс}$ обычного спектра поглощения двухцепочечной спирали. Можно предположить, что при кислых pH poly(A) также является двухцепочечной спиралью. С поли-N^6-оксиэтиладениловой кислотой при подкислении не происходит изменений КД такого рода. Поскольку этот полинуклеотид не может образовывать водородные связи, вероятно, что при кислых pH для формирования структуры poly(A) необходимы водородные связи. Эти данные позволяют предположить, что кислая форма poly(A) представляет собой

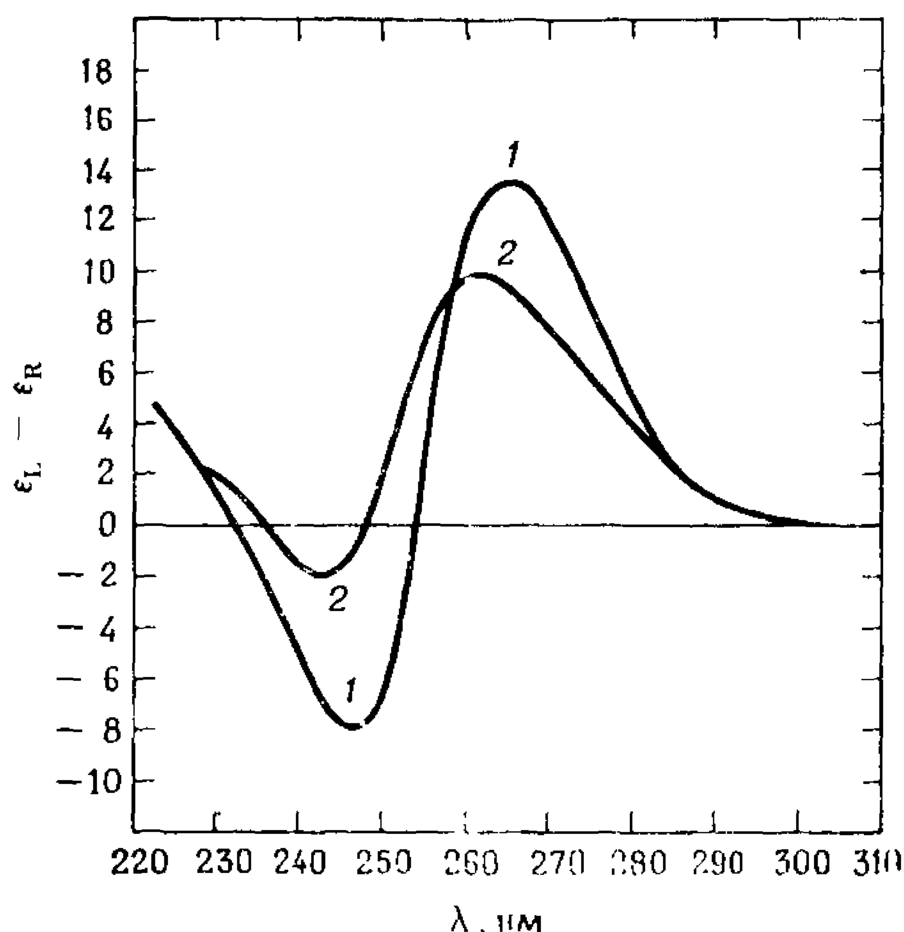


РИС. **16-16.**

Круговой дихроизм комплекса poly(A)·poly(U).

1 — сумма спектров poly(A)и poly(U), измеренных в отдельности; *2* — комплекс poly(A) и poly(U); кривая 2 смещена в область более коротких длин волн и величина отрицательного эффекта КД меньше. Это характерно для двухцепочечных полимеров. [Из работы *Brahms J.*, J. Mol. Biol., 11, 785—801 (1965).]

двухцепочечную спираль, стабилизированную водородными связями. Это согласуется с результатами рентгеноструктурного анализа пленок poly(A), приготовленных из кислого раствора (т. е. что poly(A) — двухцепочечная спираль), и является подтверждением существования в растворе структуры, определенной с помощью рентгеноструктурного анализа.

Пример 16-Ж. *Изучение комплексообразования* poly (A) с *poly(U)*. Если смешать poly(A) с эквимолекулярным количеством poly(U), образуется полимер, сила вращения которого меньше, чем сила вращения, полученная при суммировании спектров КД poly(A) и poly(U). Потеря аддитивности показывает, что спектр, по крайней мере, одного из компонентов изменился (правило *1*, табл. 16-1). Кроме того, λ_0 сместилась в область более коротких длин волн, как и в случае кислой формы poly(A). Разумно заключить, что образовался комплементарный двух(трех)-цепочечный комплекс poly(A) с poly (U). Отметим простоту наблюдений такого рода (рис. 16-16).

Пример 16-3. *Структура одноцепочечных полидезоксирибонуклеотидов.* Обычно полидезоксирибонуклеотиды имеют такие же спектры, как рибоаналоги, за исключением того, что сила вращения намного меньше. Следовательно, эти структуры менее

спиральны и, возможно, в них меньше стэкинг-конформации *. Кроме того, присутствующая в рибозе и отсутствующая в дезоксирибозе 2′-ОН-группа должна каким-то образом сказаться на форме спиральной структуры.

Пример 16-И. *Структура РНК в рибосомах.* Спектр ДОВ рибосом легко разделить на две части — спектр РНК и спектр белка, потому что эти два спектра наблюдаются в различных интервалах длин волн. Рассчитанная ДОВ РНК по существу такая же, как ДОВ рибосомной РНК, находящейся свободно в растворе, так что можно заключить, что, вероятно, РНК не претерпевает заметных конформационных изменений при сборке рибосомы. Это дает возможность предположить, что образование рибосомы происходит путем сборки белков на РНК.

Список литературы

Adler A. J., Fasman G. D., Optical Rotatory Dispersion as a Means of Determining Nucleic Acid Conformation, in "Methods in Enzymology", vol. 12B, edited by L. Grossman and K. Moldave, Academic Press, 1967, pp. 268—302. Лучший из ранних обзоров.

Adler A. J., Greenfield N. J., Fasman G. D., Circular Dichroism and Optical Rotatory Dispersion of Proteins and Polypeptides, in "Methods in Enzymology", vol. 27D, edited C. H. W. Hirs and S. N. Timasheff, Academic Press, 1973, pp. 675—735. Прекрасный современный обзор.

Brahms J., S. Brahms, Circular Dicroism of Nucleic Acids, in "Fine Structure of Proteins and Nucleic Acids", vol. 4, edited G. D. Fasman and S. N. Timasheff, Dekker, 1970, pp. 191—270. Прекрасный современный обзор.

Jirgenson B., Optical Rotatory Dispersion of Proteins and Other Macromolecules, Springer, 1969. Хороший обзор.

Kauzman W., Quantum Chemistry, Academic Press, 1957. Содержит как классическую, так и квантовомеханическую теорию оптической активности.

Mommaerts W. F. H., Ultraviolet Circular Dichroism in Nucleic Acid Structural Analysis, in "Methods in Enzymology", vol. 12B, edited by L. Grossman and K. Moldave, Academic Press, 1967, pp. 302—329. Хорошее описание эксперимента и теории.

Задачи

16-1. На рис. 16-2 показано, как можно представить образование света, поляризованного по кругу вправо. Как нужно изменить рисунок, чтобы показать образование света, поляризованного по кругу влево? Эллиптически-поляризованного света?

---

* Это несколько упрощенное рассмотрение. Известно, например, что poly (*d*A) более устойчива к диоксану, вызывающему нарушение стэкинг-взаимодействий, чем poly (A). По мнению ряда авторов, различия в КД между полидезоксирибонуклеотидами и их рибоаналогами (иногда довольно существенные!) обусловлены скорее различной геометрией стэкинга в этих структурах.— *Прим. перев.*

16-2. Если имеются два вещества, спектры поглощения которых одинаковы, а кривые КД одинаковы во всем, за исключением того, что на одной кривой наблюдается положительный КД, а на другой — отрицательный, какое предположение можно сделать о структурной взаимосвязи этих веществ?

16-3. Структура белка была определена путем рентгеноструктурного анализа кристалла белка. Найдено, что он содержит 31% α-спирали, 58% β-структуры и 11% беспорядочного клубка. По данным КД, содержание α-спирали составляет 60%, β-структуры — 35% и беспорядочного клубка — 5%. Какое заключение о структуре вы можете сделать?

16-4. Нарисуйте ожидаемую и наблюдаемую кривые КД для белка из задачи 16-3.

16-5. Почему эффекты боковых групп аминокислот легче обнаружить с помощью КД, чем ДОВ?

16-6. Если для некоторого вещества наблюдается вращение, равное $\pi/12$ радиан, как вы можете удостовериться, что на самом деле оно не $4\frac{1}{12}\pi$ радиан?

16-7. В области каких длин волн предполагали бы вы найти спектр КД тирозина в белке?

16-8. Известно, что этидийбромид интеркалирует между парами оснований ДНК. В результате связывания его происходит уменьшение силы вращения ДНК и возникновение ее для этидийбромида. Почему?

16-9. КД спектры нативной ДНК в 0,01 М NaCl и в 0,5 М NaCl отличаются мало. После кипячения ДНК (для ее денатурации) сила вращения существенно уменьшается. В каком растворителе уменьшение будет больше? Поясните. (Возможность ренатурации исключить.)

16-10. Спектры КД целого ряда фагов заметно отличаются от спектров свободной ДНК. Кроме того, спектры фагов отличаются один от другого. Какой вывод можно сделать о структуре ДНК в фагах?

16-11. Сила вращения олигонуклеотидов возрастает с увеличением числа нуклеотидных остатков приблизительно до 10; после этого изменения незначительны или их нет совсем. Объясните.

16-12. Спектры КД полиаминокислот не все одинаковы; они отличаются как силой вращения, так и $\lambda_{макс}$. Перечислите некоторые факторы, которые являются причиной этого.

ГЛАВА 17

Ядерный магнитный резонанс

Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) — еще один спектроскопический метод, способный давать информацию о структуре биополимеров, о взаимодействиях между молекулами и о молекулярном движении. Особые преимущества этого метода состоят в том, что 1) теория развита достаточно хорошо, так что в принципе из спектров ЯМР можно в деталях определить расположение индивидуальных атомов в молекуле; 2) можно определить число и положение атомов водорода, локализация которых с помощью рентгеноструктурного анализа представляет собой сложную и трудоемкую процедуру, и 3) могут быть отдельно исследованы различные атомы (например, H, N, C и P). ЯМР был очень успешно применен для определения структуры малых молекул (например, с молекулярным весом <500). Однако в случае макромолекул его возможности еще не реализованы из-за огромного числа спектральных линий, часто плохо разрешенных, больших трудностей в идентификации атома, дающего определенную линию, и ввиду значительного числа взаимодействий, в которых может участвовать каждый атом.

Вопрос о том, как подойти к проблеме определения структуры, занимает важное место в этой главе. К сожалению, из-за большой сложности предмета обсуждение будет ограниченным. Преследуемая цель состоит в том, чтобы читатель мог понимать биохимическую литературу, связанную с использованием ЯМР, и в будущем знал, когда при решении различных биохимических задач следует обращаться за помощью к ЯМР.

Из дальнейшего станет очевидным еще одно различие между ЯМР и другими методами изучения макромолекул: ограниченность применения ЯМР вызвана в основном не сложностью теории, а скорее доступностью сложной аппаратуры и сложностью получаемых спектров. Мы заострили на этом внимание, так как, по-видимому, большие успехи в применении метода определяются и будут определяться главным образом улучшением аппаратуры.

Основы теории ЯМР

Для наших целей будем рассматривать простейшее ядро (хотя большинство представлений применимо к более сложным ядрам). Кроме заряда и массы, протон обладает угловым момен-

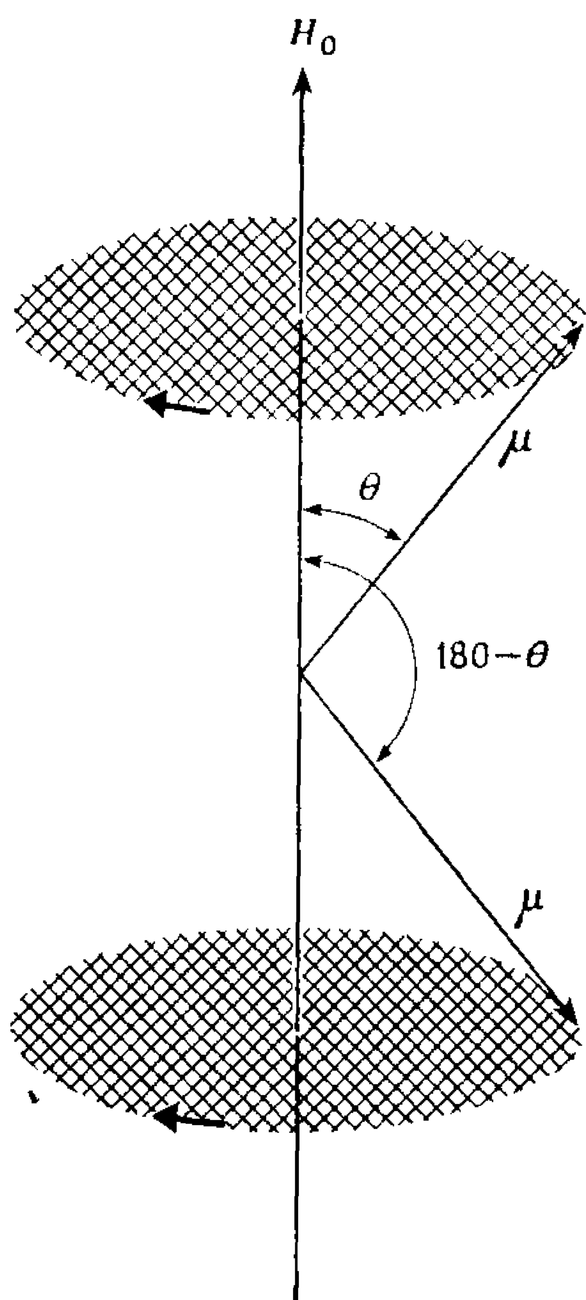


РИС. 17-1.

Прецессия вектора магнитного момента в двух спиновых состояниях ($I=\pm{}^1/_2$), индуцируемая магнитным полем H_0.

том, или *спином*. Вращающийся заряд порождает магнитное поле; его можно представить как крошечный стержневой магнит, ориентированный вдоль оси вращения. Напряженность этого магнитного поля выражается как магнитный момент μ. Подобно стержневому магниту, имеющему северный и южный полюс, μ имеет направление. Во внешнем магнитном поле макроскопический стержневой магнит ориентируется таким образом, что его магнитный момент направлен вдоль магнитных силовых линий этого поля. В случае атомных и ядерных частиц найдено, что, если протон находится в магнитном поле с напряженностью H_0, магнитный момент протона образует по отношению к направлению H_0 один из двух углов, а именно угол θ и $180-\theta$, где θ выражено в градусах (рис. 17-1). Эти две ориентации магнитного момента именуются соответственно *по полю* H_0 *и против него.* Потенциальная энергия, отвечающая каждой ориентации, есть $-\mu H_0 \sin\theta$ и $+\mu H_0 \sin\theta$ соответственно, так что разность энергий двух энергетических уровней равняется $2\mu H_0 \sin\theta$. Как обсуждалось в гл. 14, при поглощении электромагнитного излучения (в ультрафиолетовой и инфракрасной областях), энергия которого равняется разности энергий (ΔE) двух энергетических состояний, могут происходить переходы между электронными и колебательными уровнями. Возможны переходы и между энерге-

тическими уровнями ядер, только для этого требуется поглощение излучения, лежащего в области радиочастот. Так как $\Delta E = h\nu$, где ν — частота поглощаемого излучения и h — постоянная Планка,

$$\nu = \frac{2\mu H_0 \sin\theta}{h}. \qquad (1)$$

На жаргоне исследователей ЯМР поглощение излучения этой частоты приводит к «*перебросу* протона из одной ориентации в другую» (т. е. изменению ориентации магнитного момента).

Чтобы распространить сказанное на другие ядра, помимо протона, необходимо прибегнуть к характерному для каждого ядра спиновому квантовому числу I. (В литературе, приведенной в конце главы, рассматриваются факторы, от которых зависит величина I.) Число различных ориентаций и, значит, энергетических уровней данного ядра в магнитном поле равно $2I+1$, где I всегда целое или полуцелое число. Для протонов, имеющих два уровня, $I = 1/2$. (В этой главе будут рассматриться только ядра с $I = 1/2$.) Величина μ также изменяется от ядра к ядру. Значения I и μ для данного ядра трудно предсказать, так что во всех случаях они определялись путем непосредственного измерения.

В табл. 17-1 приведены характеристики нескольких ядер, представляющих интерес для биологов. Энергетические уровни ядер в отличие от электронных и колебательных уровней находятся на равном расстоянии друг от друга и в обычных условиях переходы могут происходить только между соседними уровнями. Это означает, что *для данного ядра для каждого значения H_0 имеется только одна частота перехода.*

ТАБЛИЦА 17-1

Данные ЯМР для ядер, важных в биологических системах

Изотоп	Естественное содержание, %	Спин I	Чувствительность[а]	Относительная чувствительность[б]	Приблизительный диапазон химических сдвигов, м. д.
^{1}H	99,98	$^1/_2$	1,000	1,00	12
^{2}H	0,016	1	0,0096	$1{,}5\cdot10^{-6}$	12
^{13}C	1,1	$^1/_2$	0,016	0,0002	350
^{15}N	0,37	$^1/_2$	0,001	$3{,}7\cdot10^{-6}$	1000
^{19}F	100	$^1/_2$	0,83	0,83	500
^{31}P	100	$^1/_2$	0,066	0,066	700

[а] Относительно ^{1}H при равном числе ядер.

[б] Произведение естественного содержания на чувствительность. В случае ^{2}H, ^{13}C и ^{15}N возможно обогащение (до > 99% для ^{2}H и ^{15}N), чувствительность может возрастать.

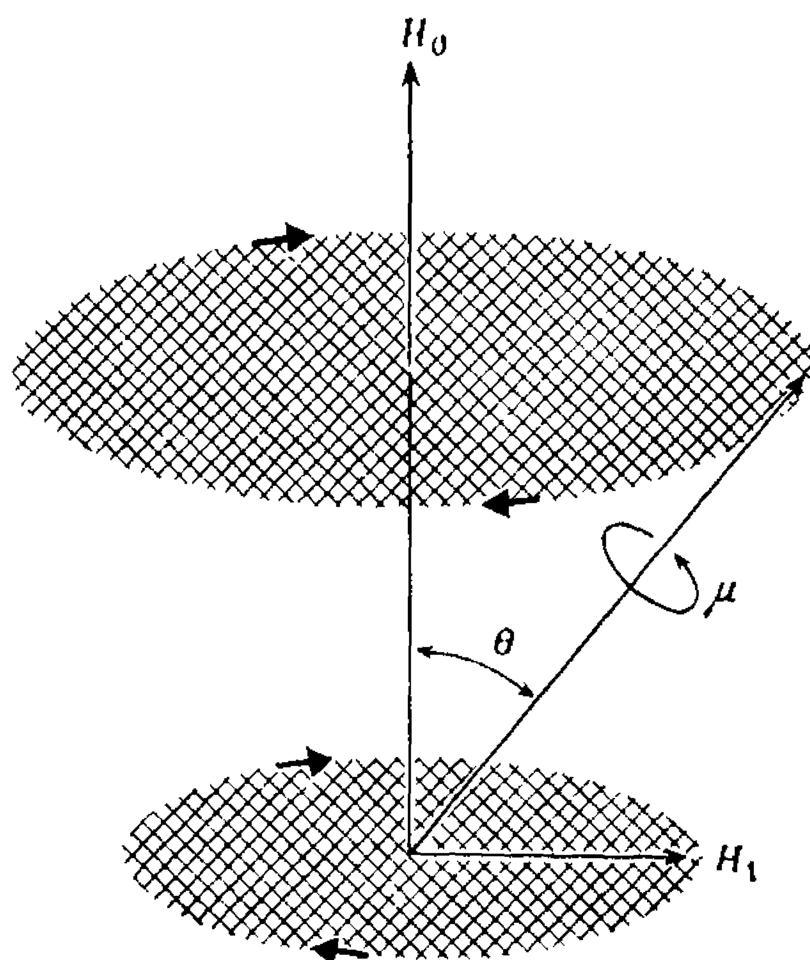


РИС. 17-2.

Магнитный момент μ вращается относительно H_0. Перпендикулярно направленное поле H_1 при ларморовой частоте индуцирует у μ вращающий момент; если H_1 вращается с ларморовой частотой, оно может вызывать вращающий момент непрерывно.

К пониманию явления резонанса можно также прийти, рассматривая теорию с точки зрения классической электродинамики. Если вращающееся ядро поместить в магнитное поле с напряженностью H_0, то в соответствии с основными законами электромагнитной теории на магнитный момент ядра будет действовать вращающий момент. Так как ядро вращается и, следовательно, имеет угловой момент, согласно закону сохранения углового момента, необходимо, чтобы магнитное ядро прецессировало вокруг направления поля так же, как гироскоп прецессирует под действием гравитационного поля (рис. 17-1). Отметим, что θ не изменяется. Угловая частота прецессии, ω_0 (называется ларморовой частотой), равняется

$$\omega_0 = \frac{2\mu}{\hbar} H_0 \sin\theta. \qquad (2)$$

Чтобы заставить ядро изменить ориентацию, необходимо, чтобы θ изменился на 180—θ. Этого нельзя сделать, увеличивая H_0, потому что такое увеличение оказывает влияние только на ω_0 и приводит к увеличению скорости прецессии. Однако, если перпендикулярно к H_0 (рис. 17-2) приложить небольшое магнитное поле H_1, на магнитный диполь будет действовать второй момент вращения, стремящийся индуцировать прецессию вокруг направления этого поля. Если $H_1 \ll H_0$, этот момент вращения намного меньше, чем тот, который вызван H_0, и, поскольку магнитный момент прецессирует и, значит, постоянно меняет направление по отношению к H_1, момент вращения, обусловленный H_1, будет оказывать незначительное влияние на ориентацию μ. Чтобы быть эффективным, H_1 должно действовать непрерывно и,

следовательно, также вращаться в плоскости, указанной на рис. 17-2, *и с той же частотой* ω_0, *что и вращающийся диполь*. Если H_1 будет вращаться с другой частотой, сила, действующая на диполь, будет непрерывно меняться по величине и направлению и прецессия, вызванная H_0, будет испытывать только периодическое качание (называемое в случае гироскопа нутацией). Так как имеется ограниченное число ориентаций μ по отношению к H_0 (т. е. поскольку система подчиняется законам квантовой механики), то передача энергии, необходимой для переориентации магнитного момента, может произойти только в том случае, если частота осцилляции H_1 равна ω_0 (так называемое условие резонанса). Отметим, что именно это выражается уравнением (1), если осциллирующее магнитное поле H_1 — просто магнитное поле электромагнитного излучения, используемого для того, чтобы перевести ядро с одного энергетического уровня на другой.

Химический сдвиг

Из предыдущего обсуждения следует, что данное ядро в определенном магнитном поле может совершить только один переход, так что спектр должен состоять только из одной резонансной линии. Однако это не так, потому что магнитное поле, действующее на ядро,— не просто приложенное поле H_0. Все ядра окружены (экранированы) электронами, и H_0 индуцирует также циркуляцию этих электронов. Так как двигающиеся электроны сами создают магнитное поле, на ядро действует эффективное поле $H_{эфф} = (1-\alpha)H_0$, где α называется константой экранирования. Другие факторы (такие, как магнитное поле, создаваемое соседними ядрами) также оказывают влияние на величину $H_{эфф}$. Все это означает, что *наблюдаемая резонансная частота зависит от окружения*. Ценность спектроскопии ЯМР (как и других видов спектроскопии) обусловлена именно этим эффектом окружения, поскольку в молекуле резонансная частота каждого ядра одинакового типа будет зависеть от химической группы, которой принадлежит ядро. Например, резонансная частота протонов метильной группы будет отличаться от частоты протонов аминогруппы, и, кроме того, частота протонов метильной группы толуола будет отличаться от частоты протонов метильной группы уксусной кислоты. Смещение резонансной частоты, обусловленное химическим окружением, называется *химическим сдвигом*.

В оптической спектроскопии каждый переход имеет определенную частоту. Однако, поскольку частота ядерного резонанса зависит от H_0, в случае ЯМР единицы обычной основной шкалы не употребляются. Кроме того, H_0 трудно измерить точно. В связи с этим для выражения условия резонанса или химического

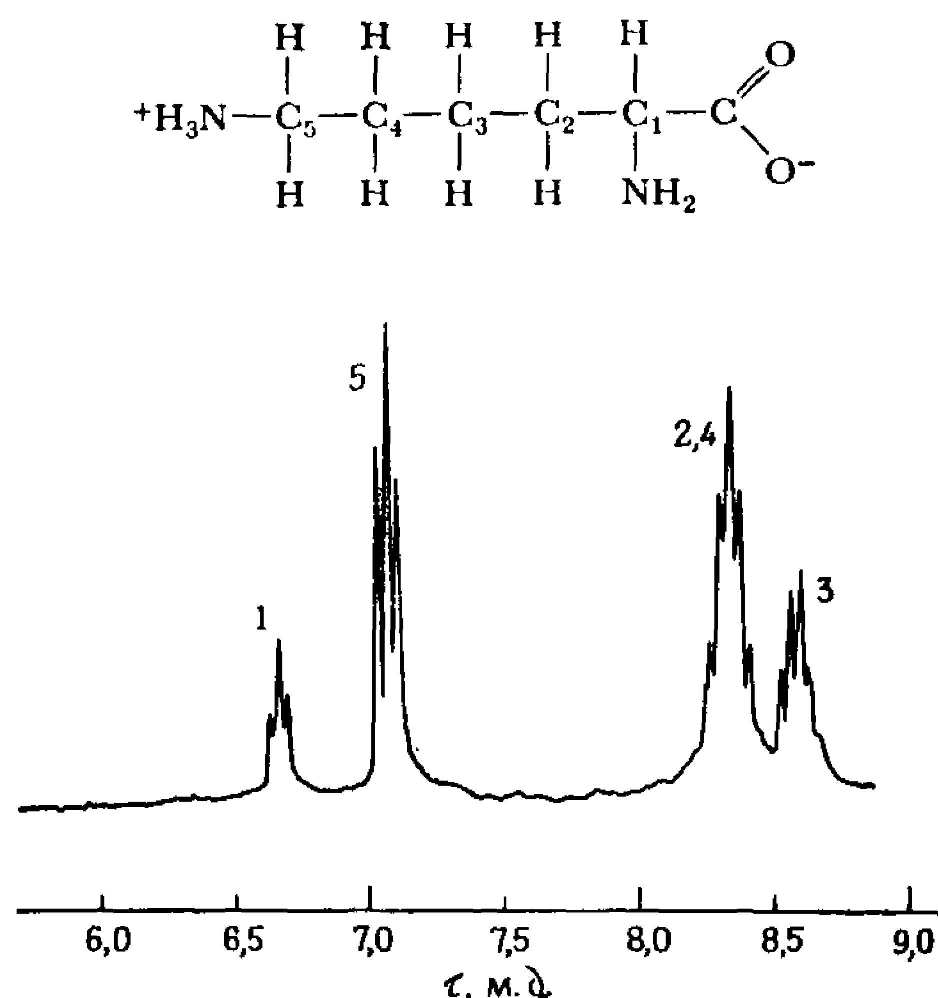


РИС. 17-3.

Спектр ЯМР лизина, находящегося в форме цвиттер-иона в D_2O. Показана структура лизина; атомы углерода пронумерованы. Номера пиков указывают атомы углерода, у которых находятся протоны, дающие данную группу линий. [Из работы *Bovey F. A.*, High Resolution NMR of Macromolecules, Academic Press, 1972.]

сдвига используют следующий подход. К образцу прибавляют эталон, его резонансной линии приписывают произвольную величину H_0 или ν_0 (вне зависимости от особенностей методики, использованной для получения спектра) и выражают химический сдвиг как смещение от этой величины. Еще лучше величину смещения от эталона выражать в виде безразмерных единиц, называемых миллионными долями (м. д.) Если меняется H, а ν постоянна,

$$\text{м. д.} = \frac{H_{\text{обр}} - H_{\text{эт}}}{H_0} \cdot 10^6, \qquad (3)$$

где $H_{\text{обр}}$ и $H_{\text{эт}}$ — магнитные поля, вызывающие явление резонанса для образца и эталона соответственно. Если меняется ν,

$$\text{м. д.} = \frac{\nu_{\text{обр}} - \nu_{\text{эт}}}{\nu_j} \cdot 10^6.$$

Преимущество такой безразмерной шкалы состоит в том, что химические сдвиги не зависят от действительной величины H_0 или частоты радиочастотного сигнала и можно сравнивать спектры, полученные на различных ЯМР-спектрометрах. Тем не менее еще

довольно часто можно увидеть данные, выраженные в виде смещения в единицах частоты или поля при соответственно фиксированном поле или частоте.

На рис. 17-3 показан протонный спектр лизина, на котором ясно видно большое количество резонансов ядер одного вида и влияние химической группы, к которой принадлежит протон, на положение сигнала.

На химический сдвиг оказывают влияние многие факторы; те из них, которые играют важную роль в биохимии, рассматриваются ниже.

Внутримолекулярное экранирование

Этот эффект вызывает сдвиги порядка 10—20 м. д. Он принадлежит к типу явлений, о которых вкратце упоминалось ранее, а именно: внешнее магнитное поле индуцирует движение электронов, окружающих ядро. Это создает у ядра поле противоположного направления по сравнению с приложенным полем, так что $H_{эфф} < H_0$. Несколько большие эффекты наблюдаются в том случае, если ядро находится у ароматического кольца или у системы сопряженных колец. π-Электроны колец «делокализованы» и мо-

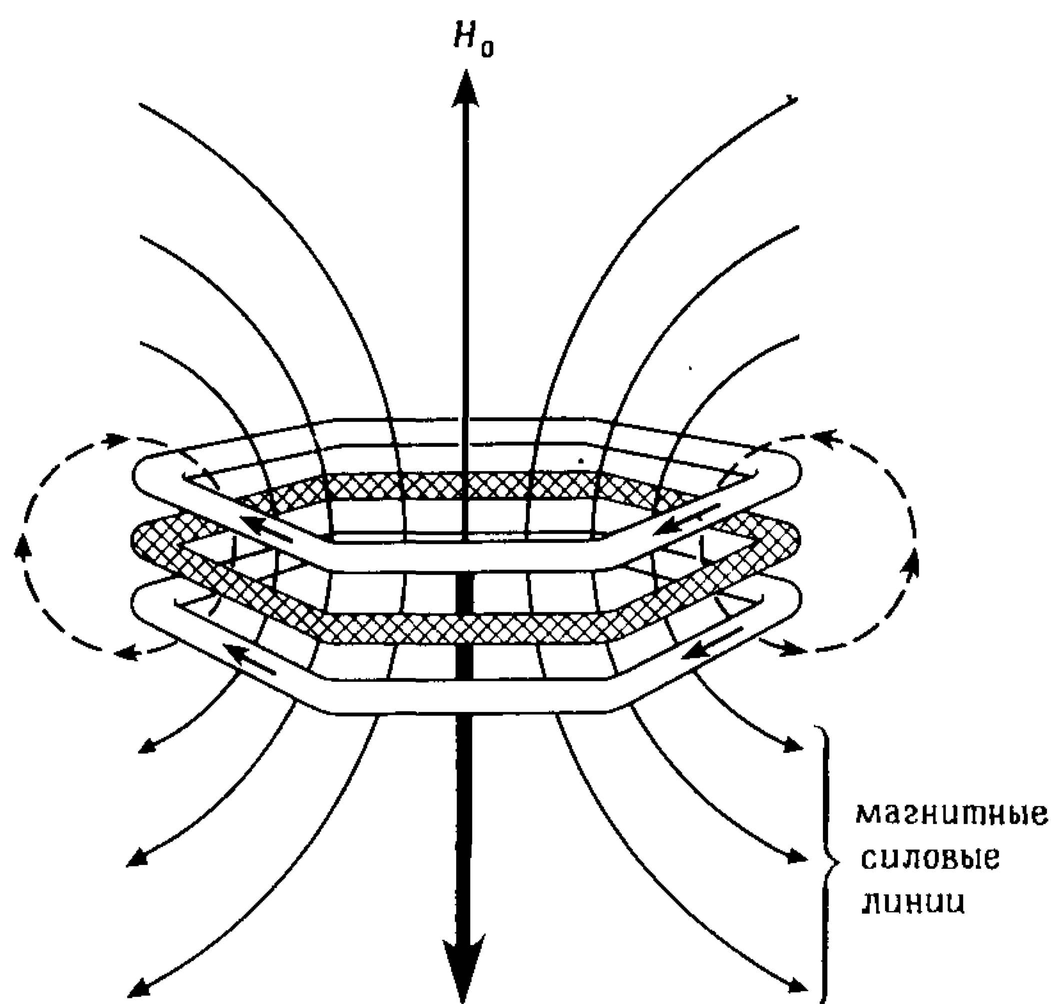


РИС. 17-4.

Электронная плотность, кольцевые токи и магнитные силовые линии бензольного кольца. Сплошная тонкая стрелка обозначает приложенное поле H_0. Сплошная жирная стрелка — магнитное поле, которое индуцируют циркулирующие электроны. [Из работы *Dwek R. A.*, Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry, Clarendon Press, 1973.]

гут свободно циркулировать в плоскости кольца. Если перпендикулярно плоскости кольца приложено магнитное поле, то в результате циркуляции электронов индуцируется магнитное поле, которое в центре кольца антипараллельно, а вне кольца параллельно приложенному полю (рис. 17-4). Это аналогично тому, что происходит при прохождении тока через проволоку. Направление результирующего химического сдвига, следовательно, зависит от локализации ядра по отношению к атомам углерода кольца. Химический сдвиг такого типа называется сдвигом, обусловленным *кольцевыми токами*. Он наблюдается в случае ароматических аминокислот, пуринов, пиримидинов, порфиринов и флавинов.

Парамагнитные эффекты

Большой химический сдвиг возникает при наличии неспаренного электрона (например, в свободных радикалах или в некоторых ионах металлов) ввиду того, что сам электрон имеет значительный магнитный момент. Сдвиг составляет от 20 до 30 м. д.; его можно обнаружить, когда неспаренный электрон находится на расстоянии 10 Å от ядра, дающего резонанс; кроме того, так как величина сдвига обратно пропорциональна кубу расстояния, эти эффекты могут быть использованы для измерений молекулярных расстояний. Однако для многих парамагнитных веществ происходит очень сильное уширение резонансных линий, так что их трудно наблюдать в спектре ЯМР. Такие парамагнитные соединения изучают с помощью электронного парамагнитного резонанса.

Межмолекулярные эффекты

Когда взаимодействуют две молекулы, распределение электронов в одной молекуле может влиять на химические сдвиги ядер другой. Если ядро находится в полимере, проявляется взаимное влияние различных участков или остатков, которые отдалены в цепи полимера, но находятся по соседству в трехмерном пространстве. Иначе говоря, при свертывании молекулы и формировании третичной структуры полимера могут оказаться сближенными удаленные химические группы, в результате чего создается новое окружение ядер и изменяются химические сдвиги; эти изменения могут быть меньше тех, которые наблюдались вследствие внутримолекулярных эффектов, описанных в предыдущем разделе. Межмолекулярные эффекты имеют большое значение для биохимии, так как с их помощью можно контролировать связывание лиганда с макромолекулой (например, взаимодействия между ферментом, кофактором и субстратом) и описать пространственную структуру участка полимера.

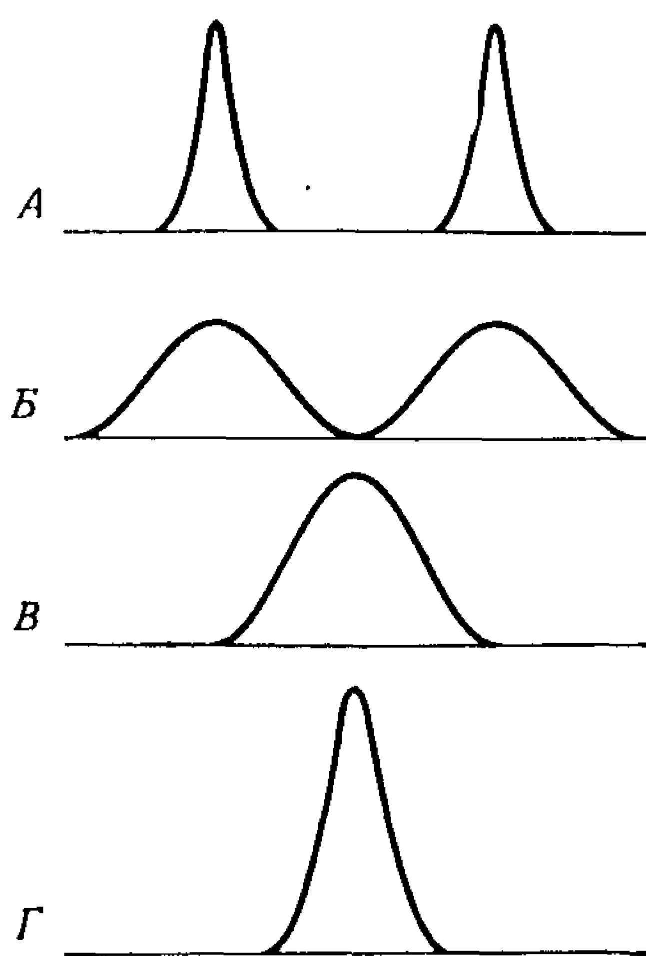


РИС. 17-5.
Форма линий при различных скоростях обмена.

Химический обмен

Если ядро находится в молекуле, которая подвергается быстрым обратимым химическим превращениям, его окружение непрерывно изменяется. Следовательно, воздействие на химический сдвиг зависит от временной шкалы обмена. Рассмотрим лиганд, который может либо связаться с другой молекулой, либо остаться свободным в растворе,— ясно, что этому отвечают два различных окружения. Если происходит очень медленный обмен лиганда между двумя состояниями, то для каждого из этих состояний будет наблюдаться свой отдельный сигнал и, следовательно, ядро в лиганде будут характеризовать два разных химических сдвига, обусловленных различным окружением ядра в двух состояниях (рис. 17-5, *А*). Если происходит более быстрый обмен, то это будет проявляться в уширении резонансных линий (рис. 17-5, *Б*). По мере того как обмен станет еще более быстрым, линии отдельных состояний сигнала уширяются настолько, что начинают перекрываться, а затем вместо них появится одна широкая полоса, занимающая промежуточное положение (рис. 17-5, *В*). Если обмен очень быстрый, то будет наблюдаться узкая резонансная линия, химический сдвиг которой есть среднее химических сдвигов ядра в свободном и связанном лиганде (рис. 17-5, *Г*). Используя это явление, удобно изучать обменные реакции и механизм ферментативных реакций. Например, можно определять число ядер в каждом состоянии, поскольку площадь резонансного сигнала пропорциональна числу ядер, дающих сигнал (см. разд. «Данные, получаемые из спектров ЯМР»).

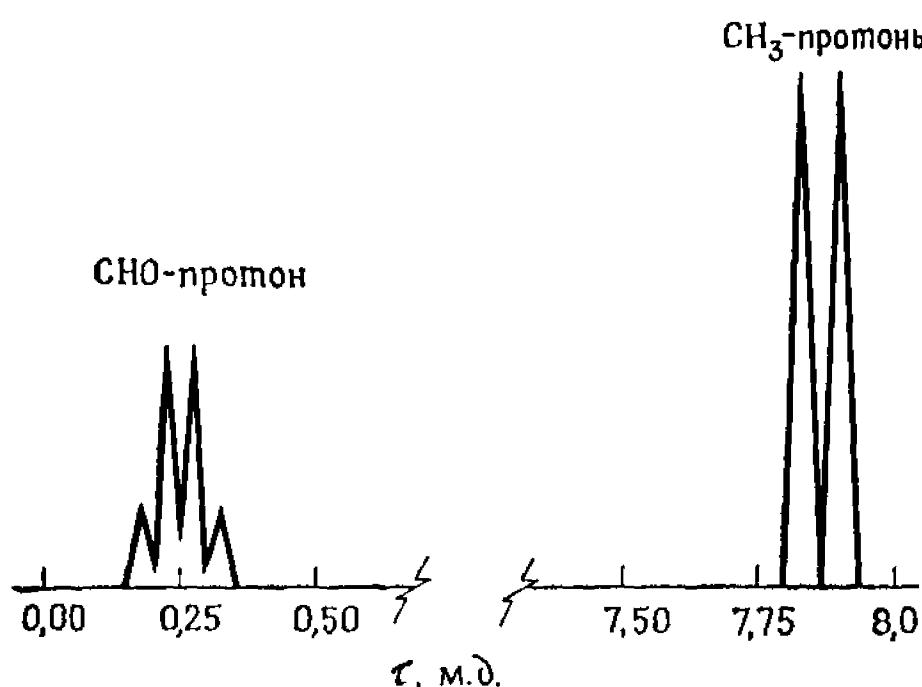


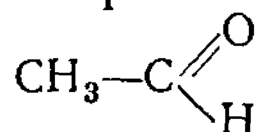
РИС. 17-6.

Спектр ЯМР ацетальдегида. Видно спин-спиновое расщепление сигналов протонов СНО- и CH_3-групп.

Спин-спиновое взаимодействие

Во всех предыдущих рассуждениях допускалось, что один протон в определенном электронном окружении дает единственную резонансную линию. Однако обычно пик состоит из группы линий (рис. 17-6). Это так называемое *расщепление линий* происходит в результате *спин-спинового взаимодействия.* Рассмотрим упрощенное объяснение этого явления. Магнитное поле ядра в любом атоме будет стремиться ориентировать валентный электрон (который сам имеет магнитный момент) таким образом, чтобы спин электрона был антипараллелен спину ядра. В диамагнитном соединении валентный электрон этого ядра обобщен с электроном второго ядра, причем спин валентного электрона второго ядра будет антипараллелен спину электрона первого ядра и, следовательно, параллелен спину первого ядра. Ориентация второго электрона оказывает влияние на ориентацию второго ядра; таким образом, первое ядро, создает магнитное поле в месте расположения второго. Подобным образом второе ядро оказывает влияние на первое. Это обоюдное взаимодействие называется *спин-спиновым* и, согласно законам квантовой механики, приводит к увеличению числа резонансов. В общем случае, если ядро взаимодействует с n одинаковыми ядрами, имеющими спин I, его линия поглощения расщепится на $2nI+1$ компонентов. Важно представлять себе, что спин-спиновое взаимодействие осуществляется только в том случае, если ядра соединены ковалентными связями (т. е. посредством общих пар электронов); оно не является результатом простого сближения, имеющего место при связывании, адсорбции или свертывании белковой молекулы.

Спин-спиновое взаимодействие можно лучше всего понять с помощью простого примера — протонного спектра ацетальдегида



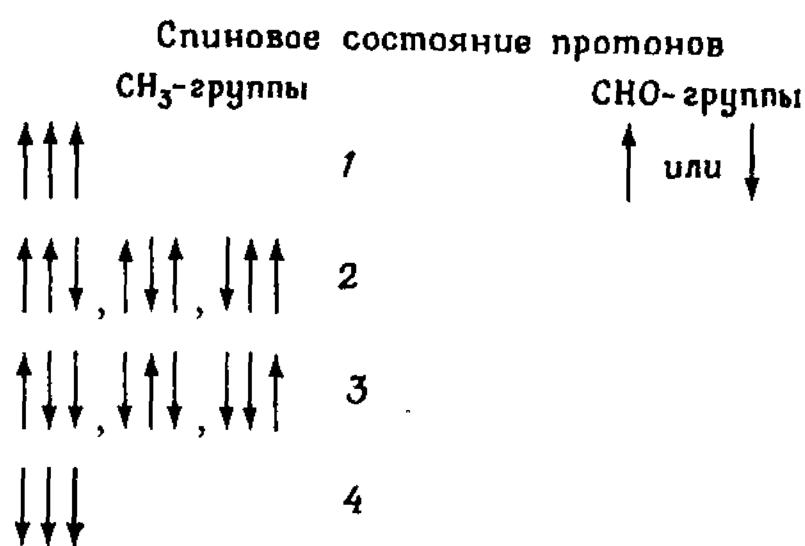


РИС. 17-7.

Возможные расположения спинов протонов СНО- и CH_3-групп в ацетальдегиде.

1 — все параллельны; 2 — два параллельны; 3 — один параллелен; 4 — все антипараллельны (относительно приложенного поля).

В этой молекуле имеется две категории протонов — три протона метильной группы и один протон СНО-группы. Молекула достаточно мала, так что две группы протонов располагаются достаточно близко и могут оказывать взаимное влияние друг на друга, приводящее к расщеплению сигналов. Поскольку каждый протон приблизительно с одинаковой вероятностью имеет спин $+^1/_2$ и $-^1/_2$ (т. е. проявляет тенденцию быть ориентированным параллельно (↑) или антипараллельно (↓) приложенному полю), расположение спинов протонов выглядит так, как показано на рис. 17-7. Отметим, что для метильной группы, имеющей три одинаковых протона, наблюдаются четыре различные ситуации: все спины параллельны; два параллельны и один антипараллелен; один параллелен и два антипараллельны и все антипараллельны. Отметим, что во втором и третьем случае возможны три конфигурации, соответствующие трем различным расположениям трех спинов. Для протона СНО-группы возможны два расположения спина, поэтому он может создавать два дополнительных поля в районе метильной группы; в результате резонанс протонов метильной группы расщепится на два пика. Поскольку параллельное и антипараллельное расположения спинов равновероятны и поскольку площадь пика пропорциональна числу ядер, дающих сигнал (см. разд. «Данные, получаемые из спектров ЯМР»), площади двух пиков дублета метильной группы одинаковы. Наоборот, в связи с четырьмя возможными расположениями протонов метильной группы линия, соответствующая протону СНО-группы, расщепляется на четыре компонента (называемых квартетом). Однако в случае метильной группы две конфигурации спинов в три раза более вероятны, чем другие (потому что они являются результатом трех возможных расположений спинов);

следовательно, отношение площадей четырех компонентов равно 1 : 3 : 3 : 1. Спектр ацетальдегида показан на рис. 17-6; легко видеть мультиплеты *. Присутствие мультиплетов помогает при идентификации ядер, дающих данные линии. С другой стороны, они могут осложнять анализ из-за присутствия неразрешенных компонентов, сигнал которых имеет вид широкой линии, или перекрывания компонентов одного мультиплета с другим, в результате чего трудно различить пики. Это особенно справедливо в случае макромолекул.

Процессы релаксации

При резонансной частоте магнитные моменты ядер переориентируются. Так как переходы с более высокого на более низкий энергетический уровень происходят с той же вероятностью, что и с более низкого на более высокий, то в результате равных заселенностей двух энергетических уровней энергия поглощения будет равна нулю. Однако, так как разность между энергетическими уровнями очень мала (приблизительно 10^{-2} кал), распределение ядер на более низком и более высоком уровнях сильно зависит от температуры. При абсолютном нуле все ядра находятся на более низком уровне. В интервале температур, обычно используемых для измерения (0—25°С), в результате теплового движения многие ядра переходят на более высокий уровень; однако на более низком уровне все еще остается небольшой избыток ядер (1 на 10^5). Когда приложено радиочастотное излучение, имеющее резонансную частоту, энергия поглощается, и заселенности более высокого и более низкого энергетических состояний выравниваются. Как только они стали равными, больше нельзя обнаружить поглощения. Чтобы поглощение было непрерывным (как и происходит на самом деле), должно каким-то образом восстанавливаться первоначальное неравное распределение. Любой процесс, при котором происходит возвращение системы к начальному состоянию, обозначается общим термином «релаксация». В оптической спектроскопии (имеющей дело с электронными и колебательными уровнями) статус-кво восстанавливается либо за счет потери поглощенной энергии в виде тепла (путем столкновений молекул), либо за счет флуоресценции. В случае ЯМР имеется два основных вида релаксационных процессов: *спин-решеточная, или продольная,* релаксация и *спин-спиновая, или поперечная,* релаксация. Эти сложные процессы

* В литературе по ЯМР бытует формулировка «метильный квартет». Важно иметь в виду, что группа из четырех линий не соответствует резонансам метильной группы, а является результатом расщепления резонанса другого протона при его взаимодействии с метильной группой.

не будут обсуждаться детально; очень упрощенно их можно представить следующим образом: движение молекул или относительное движение частей молекул приводит к возникновению локальных флуктуирующих магнитных полей, вызывающих изменения в условиях резонанса и рассеяние энергии.

Эти процессы характеризуются временами релаксации T_1 и T_2. Для тех целей, которые ставит данная глава, остается упомянуть только два важных момента, имеющих отношение к релаксации: 1) $\Delta\nu_{1/2}=1/T_2$, где $\Delta\nu_{1/2}$ — ширина резонансной линии, измеренная на половине высоты линии, и 2) T_2 зависит от молекулярного движения. При быстром движении возможность передачи энергии путем спин-спиновой релаксации понижается (так как ядра редко находятся в правильной относительной ориентации); следовательно, при быстром движении T_2 велико, а линии узкие.

Аппаратура для измерения ЯМР

Для работы ЯМР-спектрометра необходимы постоянное и переменное радиочастотное магнитные поля, держатель образца и детектор того или иного вида. Схема типичного прибора показана на рис. 17-8. Ампула с образцом *А* помещается между полюсами *Б* мощного электромагнита (обычно 10^4—10^5 Гс) внутри ка-

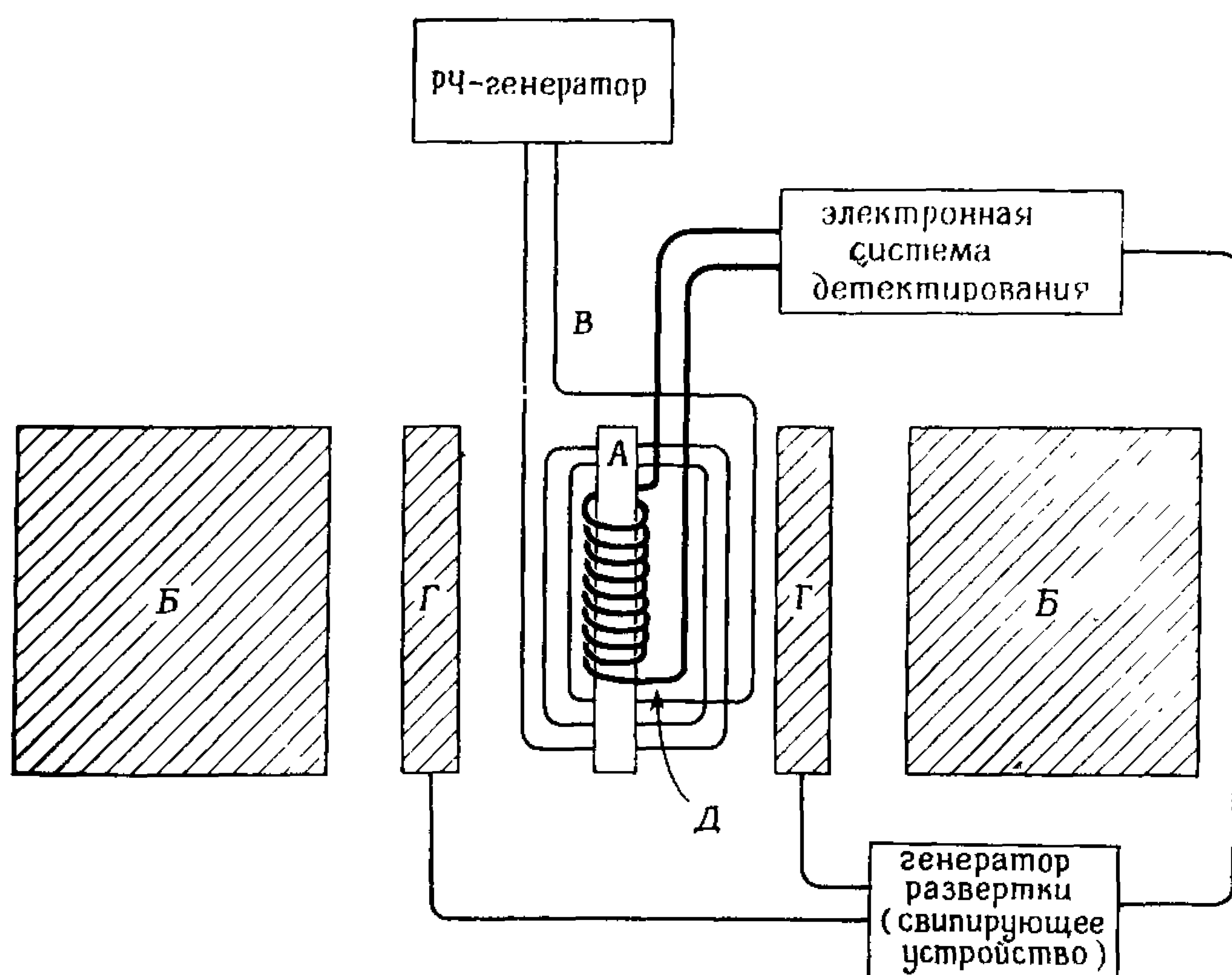


РИС. 17-8.

ЯМР-спектрометр для наблюдения спектров в стационарном режиме. Детали указаны в тексте.

тушки *В*, расположенной в плоскости, перпендикулярной полю H_0 электромагнита. Радиочастотный генератор создает в катушке осциллирующее магнитное поле постоянной частоты (приблизительно 10^8 Гц, или циклов в секунду). Частота в катушке подбирается так, чтобы она была близкой к ларморовой частоте, соответствующей H_0. Для достижения резонанса медленно увеличивают магнитное поле небольшого вспомогательного магнита *Г*. (В некоторых приборах вспомогательный магнит отсутствует, и H_1 изменяется путем изменения частоты.) В момент резонанса ядерные магнитные моменты изменяют свою ориентацию, и в результате резкого изменения магнитного поля в небольшой катушке *Д*, которая находится под прямым углом как к H_0, так и H_1, индуцируется ток. Существуют разновидности этой конструкции; наиболее важная из них реализуется в обсуждаемом ниже импульсном ЯМР-спектрометре (ЯМР-спектрометре с фурье-преобразованием).

Данные, получаемые из спектров ЯМР

Для получения информации об изучаемых молекулах используют четыре параметра спектров ЯМР: положение линии (т. е. химический сдвиг), интенсивность линии (площадь пика), ширину полосы и расщепление. Представляется важным рассмотреть, какую информацию дает каждый параметр.

1. *Положение* линии или химический сдвиг определяется локальными магнитными полями (от других ядер или неспаренных электронов) и индуцированными магнитными полями (создаваемыми окружающими электронами), в результате действия которых магнитное поле в районе ядра отличается от приложенного поля. Другими словами, в отдельной молекуле все ядра одного типа (т. е. химически идентичные) не обязательно должны быть в одинаковом окружении и, следовательно, могут иметь различные химические сдвиги.

2. Площадь или интенсивность линии пропорциональна *числу* ядер, находящихся в данном химическом окружении. Это означает, что раствор, имеющий молярную концентрацию в два раза большую, чем другой раствор, будет давать в спектре пик в два раза большей площади при одинаковых условиях регистрации и что, если ядра находятся в двух функциональных группах молекулы (например, метильных), имеющих идентичное окружение, или магнитно эквивалентных, резонанс также будет характеризоваться в два раза большей площадью. Это свойство отличает ЯМР от всех других типов спектроскопии, т. е. площадь

линии ЯМР *не зависит* от электронного окружения ядра; в случае ЯМР отсутствуют такие понятия, как вероятность поглощения или тушение.

3. *Ширина полосы* (т. е. ширина на половине высоты пика) в спектрах макромолекул в первую очередь определяется молекулярным движением.

4. *Расщепление* линий или образование мультиплета вызвано взаимодействиями ковалентно связанных ядер. Однако мультиплет часто путают с группой близко расположенных линий, соответствующих различным ядрам. Критерием наличия мультиплета (при условии, что выполняются так называемые правила первого порядка) является отношение площадей его компонентов — например, 1 : 1 для дублета, 1 : 3 : 1 для триплета, 1 : 3 : : 3 : 1 для квартета, 1 : 4 : 6 : 4 : 1 для квинтета и т. д.*

Как и в случае других спектральных методов, теория ЯМР пока не позволяет вычислять молекулярные параметры сложных молекул. Однако если идентифицированы пики (в следующем разделе обсуждается, как это делается), то, измеряя рассмотренные выше четыре параметра, можно проследить за некоторыми свойствами молекулы. На практике пользуются набором «правил», частью эмпирических, частью теоретических. Те из них, которые имеют применение в случае биологических молекул, приведены в табл. 17-2.

ТАБЛИЦА 17-2

Правила, используемые при интерпретации спектров ЯМР

1. Величина химического сдвига протонов определенной химической группы (например, метильной, этильной, окси-группы) меняется в зависимости от молекулы, частью которой является эта группа (например, определенной аминокислоты или нуклеотида).

2. Если соединение, протон которого имеет данный химический сдвиг, является мономерным звеном полимера, химический сдвиг, как правило, меняется вследствие близости остатков других молекул или групп.

а. Наибольшие сдвиги (20—30 м. д.) вызывает присутствие неспаренных электронов (т. е. парамагнитных центров).

б. Сдвиги, равные приблизительно 2 м. д., обычно наблюдаются в результате влияния кольцевых токов. Величина сдвига, обусловленного кольцевыми токами, меняется приблизительно в следующем порядке: флавины и порфирины > триптофан и нуклеотиды > гистидин > тирозин и фенилаланин.

в. Электрические поля многих заряженных групп, например, в аспарагиновой и глутаминовой кислотах, лизине, аргинине и гистидине вызывают смещение сигналов. Сдвиг мал, если группа находится на внешней части свернутой макромолекулы и, следовательно, взаимодействует в первую очередь с растворителем; он увеличивается, если группа находится внутри.

---

* Относительные интенсивности пропорциональны биномиальным коэффициентам.

3. Если в результате химического или физического воздействия на макромолекулу меняется химический сдвиг определенного протона, это значит, что произошло изменение в структуре макромолекулы в участке, окружающем протон. Если это воздействие включает изменение pH, то сдвиг скорее происходит от изменения состояния ионизации, чем от изменения пространственной структуры.

4. Наличие расщепления показывает, что две группы ядер ковалентно связаны друг с другом. По числу линий в мультиплете можно иногда установить, какая это могла быть группа. Например, квартет часто означает, что поблизости находится метильная группа. Разделение компонентов мультиплета связано с углом между группами, содержащими ядра. Иногда путем сравнения с соединениями, структура которых известна из данных рентгеноструктурного анализа, могут быть определены углы между связями в небольших простых молекулах. В случае макромолекул действие любого агента, приводящее к изменению углов между связями, должно приводить к изменению расстояния между компонентами мультиплета. Это указывает на то, какого рода конформационные перестройки могут иметь место.

5. В случае многокомпонентной системы, в которой быстро происходит самоассоциация (например, димеризация), величина химического сдвига, ширина линии и число линий (рис. 17-5) определяются относительным количеством времени, проведенным протоном в каждом состоянии. В такой системе смещение равновесия или изменение скорости обмена может приводить к изменению ширины отдельной линии или вызвать разделение сигнала на отдельные сигналы подобно тому, как показано на рис. 17-5. Изменения такого типа можно использовать для изучения равновесия.

6. Ширина линии есть мера относительной подвижности ядра. Если ядро движется очень быстро, как это бывает в малой молекуле, пики очень узкие. Если ядро движется более медленно, как в жесткой (фиксированной третичной структурой) части макромолекулы, линии становятся шире. Ширину линии можно использовать для оценки подвижности функциональной группы или мономерного остатка в полимере при условии, что изменение ширины полосы не вызвано причинами, указанными в правиле *5*, и не связано с изменением положения очень близкой неразрешенной и неотнесенной линии.

7. Связывание лиганда с участком макромолекулы обычно оказывает влияние *как на спектр лиганда, так и на спектр макромолекулы*. Хотя такие факторы, как перераспределение локального заряда, изменения в ориентации групп, находящихся на расстоянии от места связывания, и т. д. могут приводить к спектральным изменениям, во многих случаях их причиной являются ядра, расположенные в месте связывания. Обычно наблюдается смещение линии, сопровождаемое ее уширением, так как в участке связывания, вероятно, понижается свобода движения ядер.

Технические проблемы ЯМР и их решение

Очевидно, что первой проблемой ЯМР-спектроскопии является получение спектра. Для получения спектров протонного резонанса (их до сих пор регистрируют чаще всего) макромолекул, в случае которых требуются водные растворители, необходимо готовить образец не в H_2O, а в D_2O, чтобы удалить мощный резонанс протонов H_2O, который иначе (так как концентрация H_2O равна 55 молям) будет маскировать большинство изучаемых ре-

зонансов протонов. К сожалению, использование D_2O затрудняет наблюдение протонов, связанных с азотом или кислородом, так как эти протоны могут быстро обмениваться с ядрами дейтерия растворителя и поэтому их сигналы исчезают из спектра. (А резонансы ядер ^2H наблюдаются в дургом диапазоне частот и характеризуются низкой чувствительностью детектирования.) Таким образом, обычно наблюдают сигналы протонов, связанных с атомами углерода. Чтобы выразить все данные в виде миллионных долей, часто добавляют эталон. Для растворов в органических растворителях обычно используют тетраметилсилан. Часто в качестве эталона добавляют небольшие количества *трет*-бутанола или можно использовать сигналы DHO, которая в виде примеси содержится во всех образцах D_2O. С помощью специальных методик, применяя фурье-спектроскопию ЯМР, можно подавить резонанс H_2O и работать в водном растворе.

При работе с другими ядрами (например, с обсуждаемым ниже ^{13}C) H_2O можно использовать как растворитель, так как диапазон используемых в этих случаях частот лежит далеко от резонансной частоты H_2O.

Вторая проблема спектроскопии ЯМР — необходимость регистрировать сигналы низкой интенсивности. Сигнал ЯМР имеет слабую интенсивность по сравнению с фоновым шумом приборов. Уменьшить этот эффект позволяет следующий прием: много раз подряд осуществляют развертку спектра, суммируют результаты и усредняют спектры (каждая развертка обычно называется *сканированием*). Поскольку шум носит случайный характер, он будет «усредняться». Интенсивность шума возрастает пропорционально $\sqrt{N}$, где N — число сканирований, а сигнала — пропорционально N. На практике это выполняется с помощью небольшой вычислительной машины, называемой многоканальным амплитудным анализатором. На рис. 17-9 показано, что дает применение этой методики. После одного сканирования сигнал не виден, но после нескольких сотен резонансы становятся различимыми. С помощью этой методики можно обнаружить сигнал данного протона при концентрации раствора 10^{-3} М. Чувствительность при детектировании других ядер ниже (см. табл. 17-1), и требуется более высокая концентрация. Как будет показано в следующем разделе, с помощью фурье-спектроскопии ЯМР появляется возможность в десять раз увеличить отношение сигнала к шуму и обнаружить протоны при концентрации 10^{-4} М.

Третья важная проблема — разрешение сигналов — возникает в связи с огромным числом пиков (100—1000) в спектрах многих макромолекул. Однако, так как химический сдвиг линейно зависит от величины H_0, эту проблему можно решить путем конструирования более мощных магнитов. Самые большие поля ($\sim$5Т) создают в настоящее время сверхпроводящие магниты.

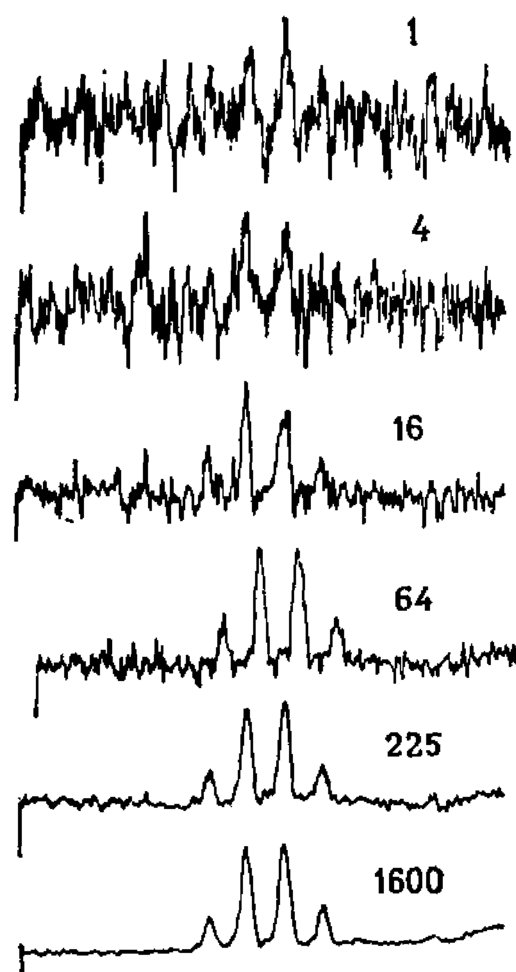


РИС. 17-9.

Разрешение квартета метиленовой группы этилбензола при увеличении числа сканирований. (Courtesy of Varian Associates). У каждого спектра приведено число сканирований.

Вместе с тем, конечно, необходимо увеличивать частоту электромагнитного излучения; теперь доступны радиочастотные генераторы, создающие частоту $3 \cdot 10^8$ Гц, но они еще не получили широкого распространения. В случае других ядер (не протонов, например, ^{13}C) проблема разрешения стоит менее остро, так как они обладают намного большими химическими сдвигами.

После того как получен спектр высокого разрешения, возникает последняя проблема — идентифицировать пики, т. е. идентифицировать ядро, дающее данный пик. Это нетрудно сделать для небольших молекул, в случае же больших молекул это всегда непросто, хотя можно легко разобраться в необходимых для этого методах, которые описаны в следующем разделе.

Отнесение линий для белков и полинуклеотидов

Идентификацию пиков в полимерах обычно проводят следующими методами:

1. Сводят в таблицу спектры аминокислот, нуклеотидов и некоторых функциональных групп. Как эти спектры изменяются от pH и некоторых растворителей, довольно хорошо известно. Многие из этих веществ имеют достаточно характерный набор линий, положения которых определены, так что их можно довольно просто выделить в сложном спектре. Примеры трех таких спектров показаны на рис. 17-10. Этот метод, возможно, один из наиболее общих методов идентификации пиков.

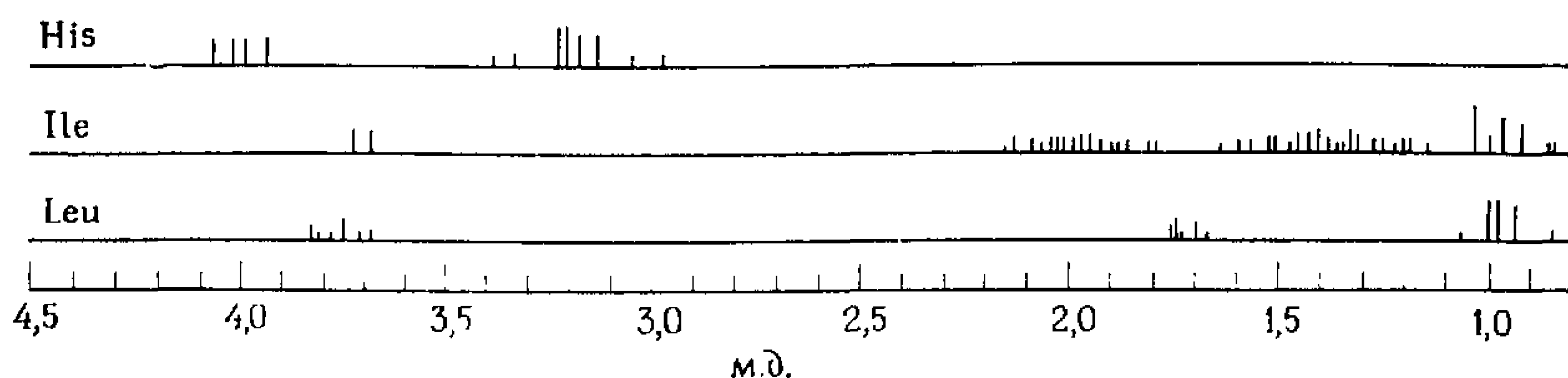


РИС. 17-10.

Спектры молекул гистидина, изолейцина и лейцина, находящихся в форме цвиттер-иона. Относительная высота линий соответствует площадям пиков в подлинных спектрах.

2. Если последовательность аминокислот в белке известна, его можно расщепить при помощи ферментов и определить спектр некоторых очищенных фрагментов в отдельности. Таким путем удается иногда показать, что пики соответствуют определенным участкам молекулы. Ограниченность этого метода состоит в том, что химические сдвиги определенных групп не всегда одинаковы в различных фрагментах, так как взаимодействие этих групп с другими частями молекулы может быть неодинаковым. Этот метод обычно не представляет значительной ценности для высокомолекулярных структур, но применим к олигопептидам.

3. В результате химических реакций с определенным остатком в полимерной цепи или связывания лиганда с этим остатком определенные линии исчезают или смещаются. Обычно такого рода процессы сопровождают значительные конформационные изменения, так что их влияние на вид спектра может быть и косвенным. Изредка, однако, ситуация бывает более благоприятной и пики могут быть идентифицированы этим путем.

4. Некоторые полимеры могут быть селективно дейтерированы путем выращивания организма на среде, содержащей определенный дейтерированный мономер. В этом случае сигналы протонов дейтерированного остатка исчезнут. Наоборот, организм можно вырастить на полностью дейтерированной среде, за исключением единственного мономера, содержащего протоны, тогда будут видны только пики, соответствующие содержащим протоны фрагментам. Этот метод надежен, но он очень дорогой из-за высокой стоимости дейтерированных соединений.

5. Были измерены спектры белков и полинуклеотидов, пространственная структура которых точно известна из рентгеноструктурного анализа. С ними можно сравнить спектры образцов. Это очень полезный и довольно общий метод с той оговоркой, что структура, установленная по данным рентгеноструктурного анализа, — это структура в кристалле, порошке, либо в ином сухом

материале, в то время как спектры ЯМР получены в растворе. К тому же, имеется не так много макромолекул с точно известной структурой.

Суммируя сказанное, можно сказать, что для идентификации пика никогда не используется один метод; обычно необходимо использовать несколько методов, проявив при этом выдумку и мастерство.

Определение химической структуры малых молекул

Наиболее простым применением ЯМР является определение структуры несложных органических молекул. Для органической химии это обычная методика, но она редко используется в биохимии. Базируется она на том факте, что для простых молекул довольно хорошо определены химические сдвиги таких функциональных групп, как метильная, аминогруппа и т. д. Следовательно, если известна химическая формула, спектр ЯМР может указать на функциональные группы. Наличие мультиплетов спин-спинового расщепления к тому же свидетельствует о близости функциональных групп (как на рис. 17-6). Этот метод не будет обсуждаться здесь, так как его описание можно найти во многих учебниках по органической химии.

Использование ЯМР для изучения структуры белка

Потенциальные возможности метода ЯМР позволяют извлекать большое количество информации о структуре белка, так как параметры спектров чувствительны к изменениям как последовательности, так и конформации. Например, в отсутствие всякого взаимодействия спектр полипептида или белка был бы суммой спектров составляющих аминокислот, каждый из которых хорошо известен. Однако этого не происходит, как видно из рис. 17-11, на котором изображен спектр фермента лизоцима в нативной и денатурированной (беспорядочный клубок) формах и спектр, рассчитанный по аминокислотному составу. Ясно, что существует много различий между наблюдаемым и рассчитанным спектрами — это обычная ситуация. Хотя эти различия меняются от белка к белку, в спектрах имеется несколько общих черт, которые, по-видимому, являются характерными для большинства белков. Например, как правило, большие химические сдвиги наблюдают-

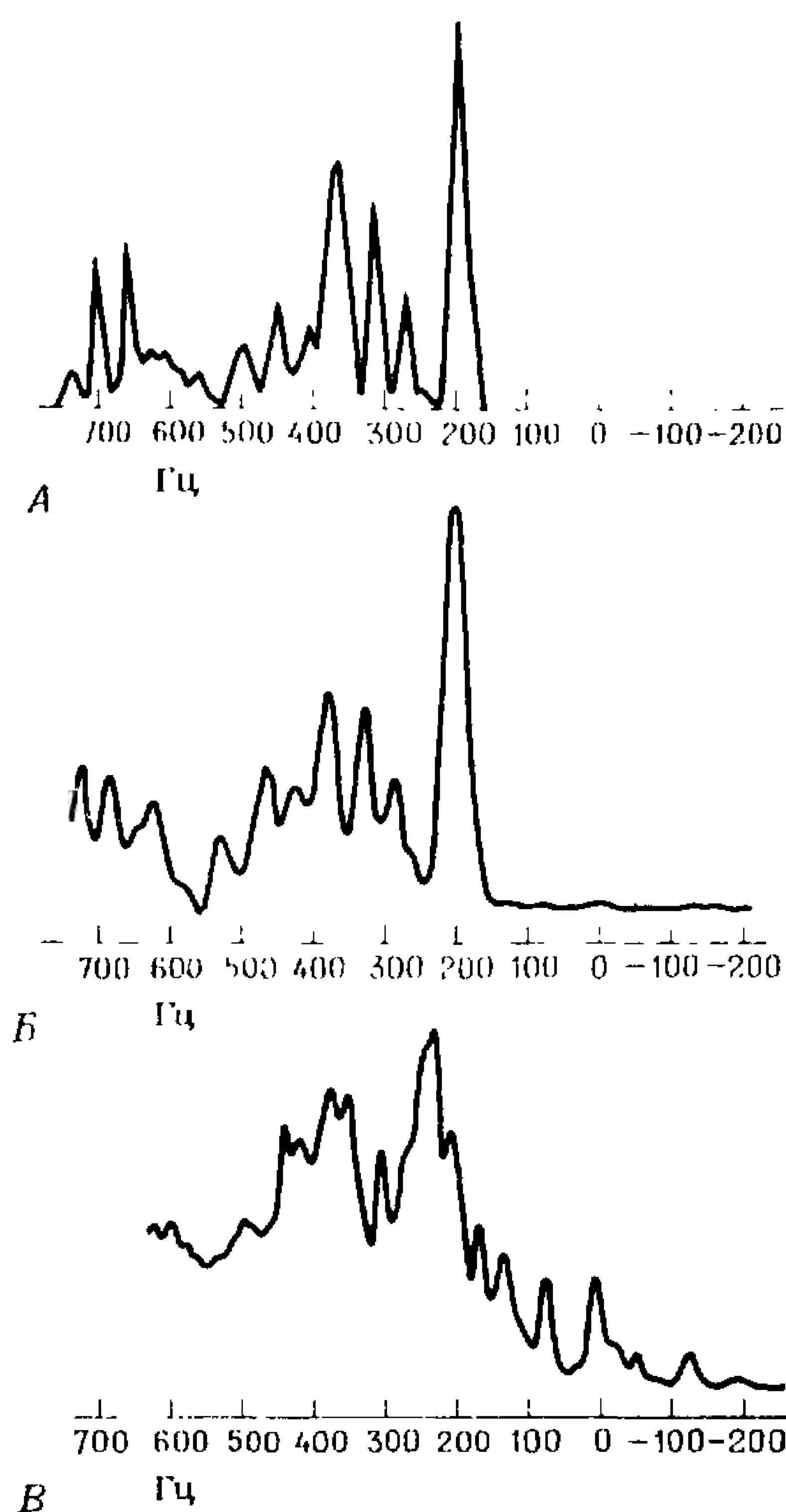


РИС. 17-11.

Фрагмент протонного спектра лизоцима.

А — рассчитанный; *Б* — наблюдаемый спектр денатурированного лизоцима; *В* — наблюдаемый спектр нативного лизоцима. [Перепечатано с разрешения *McDonald C. C., Phillips W. C.*, J. Amer. Chem. Soc., 91, 1513—1521 (1969). Copyright by the American Chemical Society.]

ся, если протон находится в N- или С-концевой аминокислоте либо по соседству с атомом азота пептидной связи, а маленькие сдвиги имеют место, если протон расположен по соседству либо с атомом углерода пептидной связи, либо с атомом углерода или атомом азота ближайшей соседней аминокислоты. Кроме того, если белок находится в нативной конформации, имеются характеристические химические сдвиги некоторых протонов аминокислот, вызванные расположением аминокислот в α-спирали. К сожалению, величина изменений химических сдвигов, ширины полосы и интенсивности, обусловленных третичной структурой и близостью удаленных аминокислот (например, из-за сдвига, связанного с эффектом кольцевых токов или с водородными связями), неодинакова для разных белков и отсутствуют действительно общие принципы, которые могли бы быть сформулированы в виде эмпирических правил.

То, что на спектры ЯМР аминокислот оказывают влияние вторичная и третичная структура белков, теоретически позволяет определять пространственную структуру белков; однако этого

еще не было сделано как из-за большой сложности анализа, так и по следующим причинам.

Во-первых, типичный белок имеет около 850 линий, многие из которых перекрываются. Поскольку на ширину линии влияет подвижность молекулы (табл. 17-2, правило *6*), которая возрастает (грубая оценка) с уменьшением коэффициента диффузии и, следовательно, с увеличением молекулярной массы, пригодные для обработки спектры (в которых линии могут быть разрешены) получены в настоящее время только для молекул с молекулярной массой меньше 25 000. Во вторых, для однозначной идентификации линий требуется знать полностью аминокислотную последовательность. Это не всегда возможно, но даже знание аминокислотной последовательности как правило не помогает из-за дополнительных взаимодействий, обусловленных третичной структурой. Для идентификации сигналов проводят избирательное дейтерирование или изучают наблюдаемые при титровании определенных аминокислот изменения химических сдвигов. Но эти приемы не всегда помогают. В результате в сложном белке остается неидентифицированным значительное число линий. Тем не менее из спектров может быть получено много информации.

В настоящее время ЯМР успешно используется для изучения белков в пяти случаях: 1) определение доли аминокислот в α-спиральной конформации с целью подтверждения существования в растворе структуры, установленной по данным дифракции рентгеновских лучей; 2) контроль за переходами спираль — клубок; 3) определение конформации выбранных участков белка (например, вблизи определенной аминокислоты); 4) наблюдение связывания малых молекул и ионов металлов с выбранными участками белка (на основании спектра либо лиганда, либо белка) и 5) исследование парамагнитных активных центров в белках — переносчиках электронов.

Несколько примеров иллюстрируют, какого рода заключения могут быть сделаны и какими методами проводят анализ данных.

Пример 17-А. *Доля аминокислот, участвующих в образовании α-спирали в поли-γ-бензил-*L*-глутамате.* В некоторых полипептидах для протона при α-углероде наблюдаются два различных химических сдвига в зависимости от того, принадлежит ли атом углерода α-спирали или беспорядочному клубку (рис. 17-12). Так как площадь пика пропорциональна числу протонов, дающих данный резонанс, и на звено α-спирали приходится один протон у α-углерода, можно использовать относительные площади двух пиков для расчета доли аминокислот, участвующих в α-спиральной конформации. Доля аминокислот равна

$$\frac{A_C}{A_C + A_K},$$

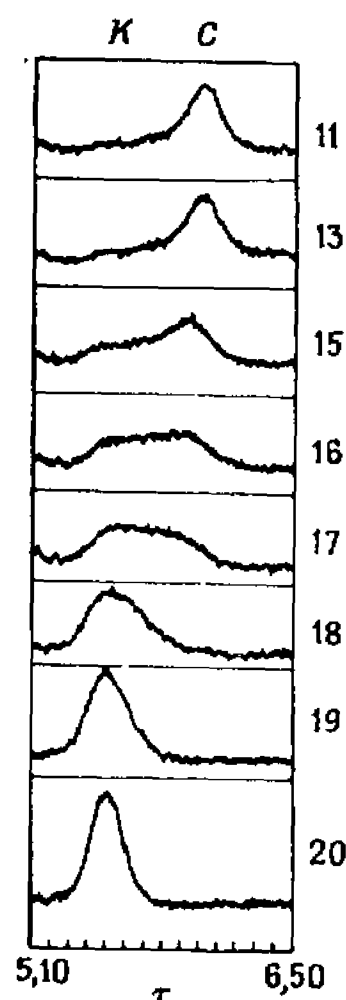


РИС. 17-12.

Фрагмент спектра поли-γ-бензил-L-глутамата в $CDCl_3$, к которому добавлена трифторуксусная кислота (ТФУ): пик изображает только сигнал протона у α-углерода; С и К относятся к положению линий, отвечающих конформациям α-спирали и беспорядочного клубка соответственно; числа указывают процент добавленной ТФУ.

[Перепечатано с разрешения *Ferretti J. A., Ninham B. W., Parsegian V. A.*, Macromolecules, 3, 30—42 (1970). Copyright by the American Chemical Society.]

где A_c и $A_К$ — площади пиков спирали и беспорядочного клубка соответственно.

Пример 17-Б. *Развертывание белков.* Денатурация белков приводит к существенным измснениям в ЯМР-спектрах. Линии становятся у́же, так как свобода движения возрастает, а химические сдвиги одинаковых аминокислот приближаются друг к другу. Рассматривая ширину и положение линии как функцию pH, температуры, концентрации различных денатурирующих агентов и т. д., можно проследить за независимым развертыванием различных частей белка.

Например, рассмотрим термическую денатурацию гипотетического белка, в спектре которого содержится несколько линий гистидина (His) и одна линия триптофана (Trp), соответствующих, допустим, каким-то определенным протонам этих аминокислот (рис. 17-13). Индексы *Н* и *К* обозначают положение линий для нативной конформации и конформации беспорядочного клубка соответственно. При 25°C белок находится в нативной конформации и вследствие различного окружения различные гистидиновые остатки имеют неодинаковые химические сдвиги. Линия триптофана должна соответствовать нескольким остаткам в одинаковом окружении, так как площадь под ней больше, чем площадь под линией любого гистидина (напомним, что площадь сигнала пропорциональна числу протонов). При 37°C линии гистидиновых остатков сдвигаются до того положения, которое они занимали в беспорядочном клубке. Следовательно, участок белка, содержащий гистидиновые остатки, должен иметь относительно низкую термическую устойчивость по сравнению с участ-

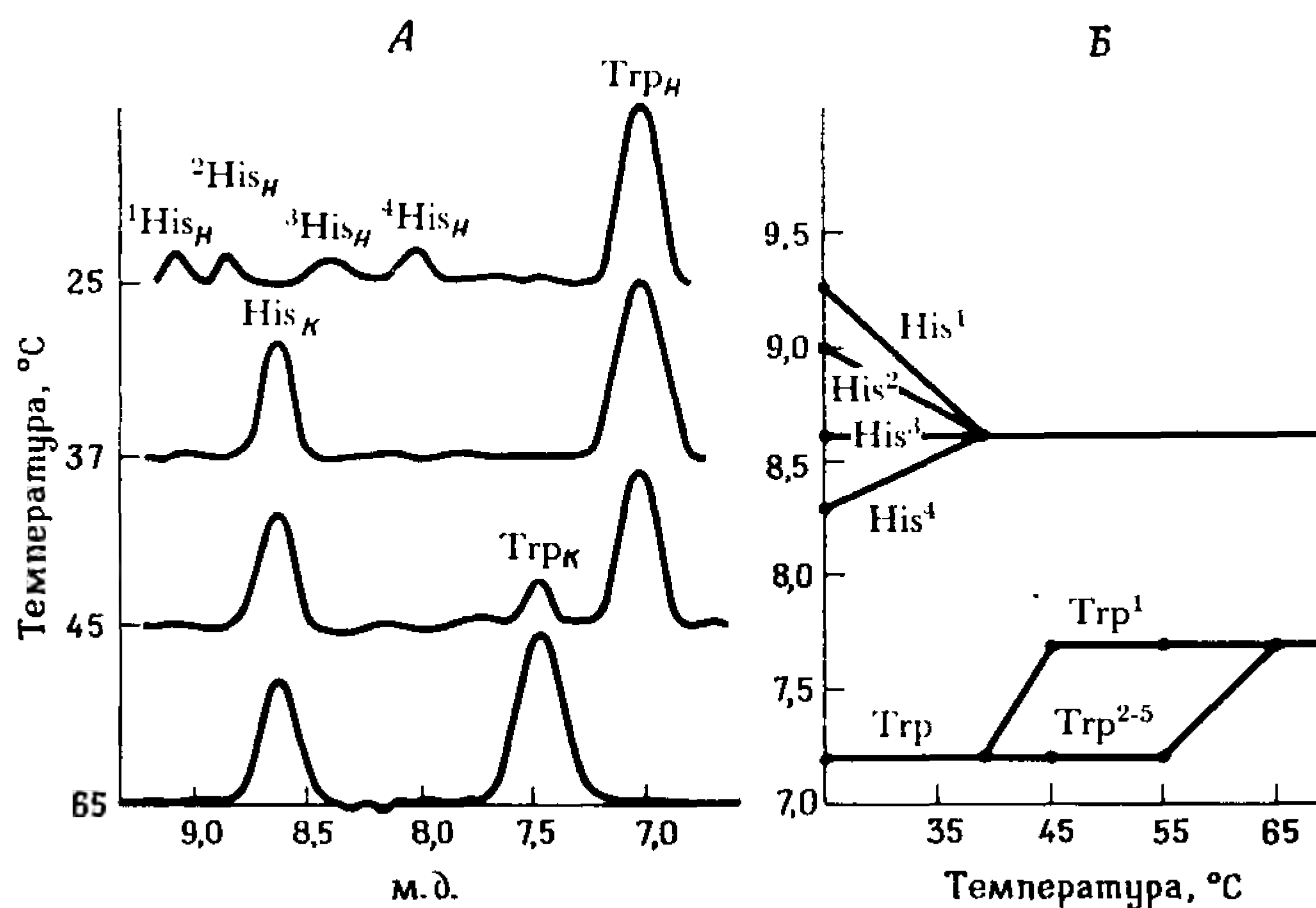
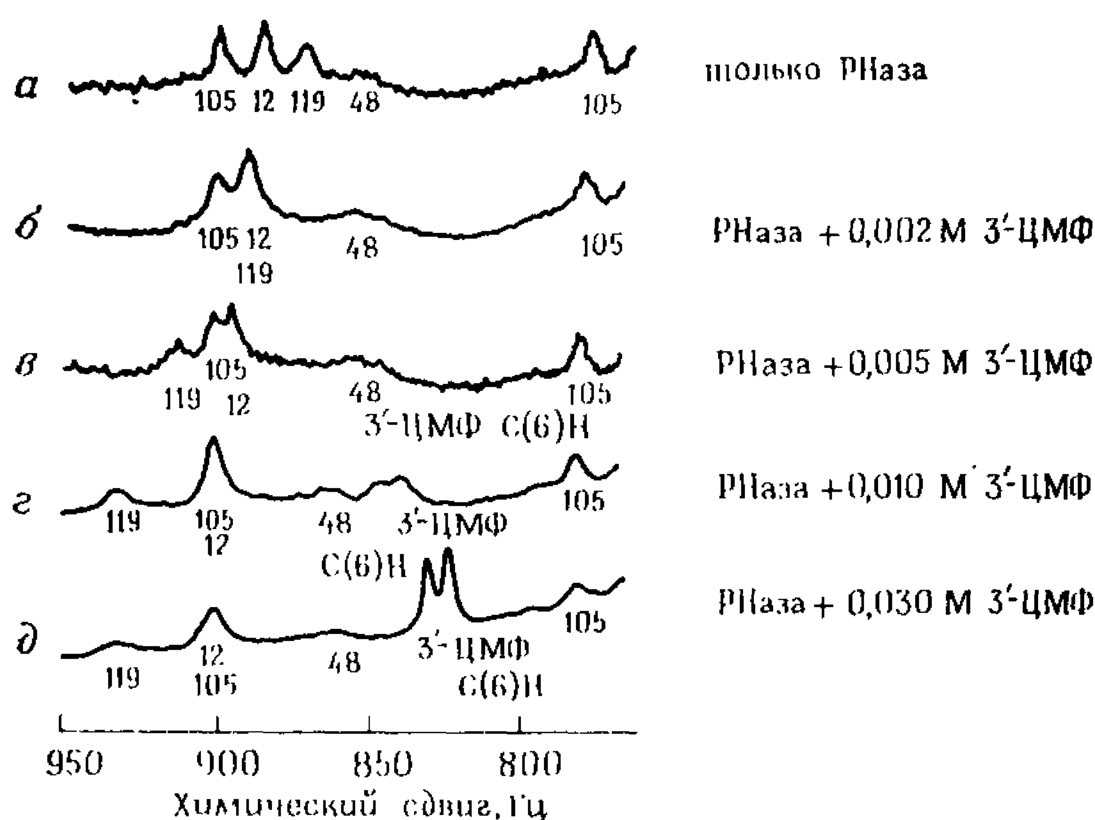


РИС. 17-13.

А — спектры гипотетического белка при различных температурах. Нарисованы только линии, имеющие отношение к обсуждению. В реальном белке в этом районе может находиться до 50 дополнительных линий. *Б* — график зависимости положения линии от температуры для каждой линии, изображенной в части *А*.

ком, содержащим триптофановые остатки. При 45°С появляется линия, соответствующая Trp$_K$. Так как линия Trp$_H$ остается, остатки триптофана должны находиться по крайней мере в двух различных участках белка, а именно в том, который разрушается при 45°С, и в другом, который не разрушается. Из отношения площадей 1 : 5, отвечающих Trp$_K$ и Trp$_H$, следует, что $^1/_6$ триптофановых остатков находится в участке, который при 45°С является беспорядочным клубком. Линия Trp$_K$ по ширине такая же, как и линия Trp$_H$; это предполагает, что Trp должен был находиться в очень гибком участке молекулы. Около 65°С линия Trp$_H$ исчезает, следовательно, все участки, содержащие триптофан, денатурированы.

Отметим, что исследование ЯМР дает больше информации, чем можно было бы получить при анализе денатурации гидродинамическими методами. Например, если этот белок изучался бы методом вискозиметрии (гл. 13), мы бы просто наблюдали непрерывное изменение вязкости в том же самом температурном интервале, и это отражало бы *усредненное* состояние молекулы. Напротив, анализ ЯМР дает информацию о состоянии *отдельных* участков молекулы.



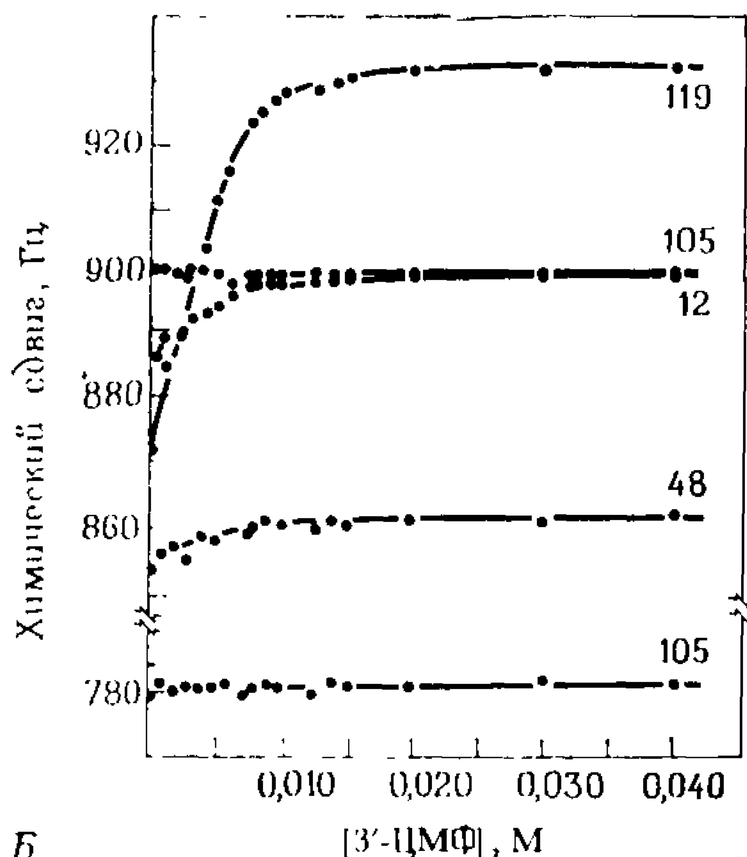


РИС. 17-14.

А — фрагмент протонного спектра, на котором видны сигналы, соответствующие гистидиновым остаткам РНазы, при различных концентрациях добавленного 3′-ЦМФ. Цифры относятся к определенному гистидиновому остатку. *Б* — график, построенный по данным части *А*. [Из работы *Meadows D. H., Jardetzsky O.,* Proc. Nat. Acad. Sci., **61**, 406—413 (1968).]

Пример 17-В. *Свойства активного центра рибонуклеазы А.* Структура активного центра панкреатической рибонуклеазы А была установлена путем изучения в спектрах ЯМР сигналов протонов в положении С-2 гистидиновых остатков при добавлении различных концентраций ингибитора — 3′-цитидинмонофосфата (3′-ЦМФ), связывающегося с активным центром фермента, в определенном интервале значений pH. В этом ферменте имеется несколько гистидиновых остатков, но при добавлении 3′-ЦМФ (рис. 17-14) значительно меняются сдвиги только трех из них

(12, 48 и 119)*, причем изменение сдвига гистидина-119 гораздо больше других. Ясно, что, когда добавляется 3′-ЦМФ, каждый гистидин попадает в новое окружение. Проблема состоит в том, чтобы определить, какой гистидин участвует в прямом связывании с ингибитором. Изучение химического сдвига пика протона С-2 имидазола (ароматической части гистидина) как функции концентрации фосфата (т. е. используя имидазол вместо гистидина и фосфат — вместо 3′-ЦМФ) показывает, что кривая зависимости химического сдвига имидазола от концентрации совпадает с аналогичной кривой для гистидина-119. Следовательно, наблюдаемый химический сдвиг протона С-2 гистидина-119 *может быть* результатом связывания последнего с фосфатной группой 3′-ЦМФ (табл. 17-2, правило 7). Это можно проверить путем дальнейших исследований, используя ингибиторы 2′-ЦМФ и 5′-ЦМФ, константы связывания которых с рибонуклеазой отличаются. Химический сдвиг гистидина-12, как и зависимость этого сдвига от pH, одинаковы для комплексов с каждым из трех ингибиторов, даже несмотря на различие в связывании. Другими словами, гистидин-12 не несет ответственности за факторы, влияющие на связывание ингибиторов; можно предположить, что гистидин-12 не участвует в связывании фосфата. С другой стороны, и химические сдвиги, и pH связывания гистидина-119 различаются для комплексов с каждым из трех ингибиторов, т. е. гистидин-119 чувствителен к положению фосфата и поэтому, возможно, непосредственно с ним связывается. Однако изменения химических сдвигов для гистидина-12 достаточно велики, т. е. эта аминокислота, по-видимому, находится в активном центре или недалеко от него. Небольшое смещение сигнала протона С-2 в случае гистидина-48 является, вероятно, результатом конформационной перестройки белка, индуцируемой связыванием.

По соседству с гистидином-119 находится фенилаланин-120. Линии, которые дает этот остаток, не были однозначно идентифицированы; однако, так как в кольце Phe пять протонов и имеется пик соответствующей интенсивности в ароматической области спектра, можно допустить, что этот пик соответствует фенилаланину. При добавлении 3′-ЦМФ положение этого пика сильно изменяется, но если добавить только фосфат, смещения не происходит. Это позволяет предположить, что связывание включает также взаимодействие между остатком цитозина в 3′-ЦМФ и фенилаланином. Следует отметить, что это только предположение, потому что не ясно, принадлежит ли этот пик действительно фенилаланину-120.

* Эти цифры или другие обозначения: His-12, His-48 и т. п.— относятся к положению аминокислоты в полной аминокислотной последовательности белка.

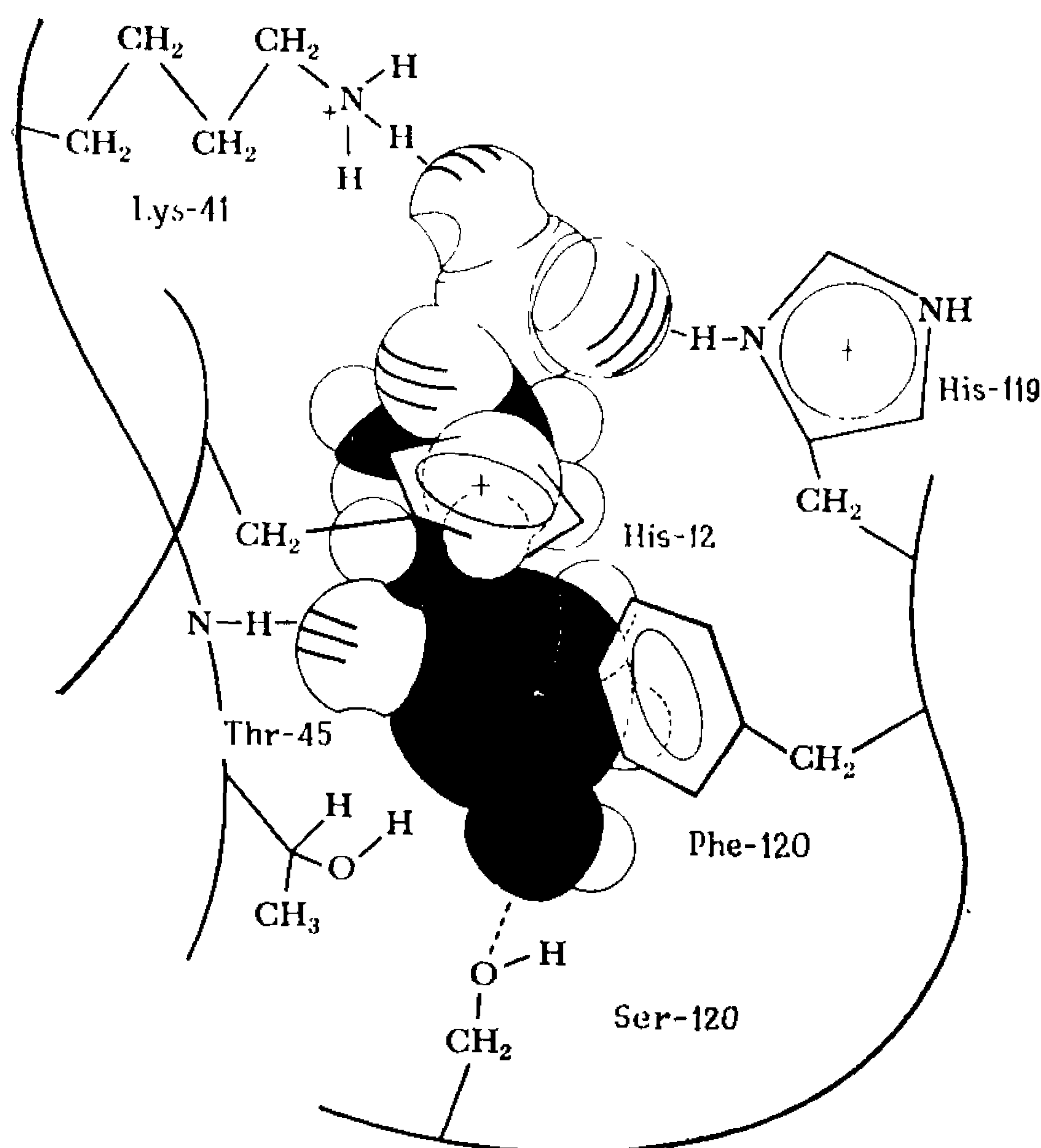


РИС. 17-15.

Постулированная структура комплекса 3′-ЦМФ и рибонуклеазы. [Из работы *Meadows D. H., Roberts G. C. K., Jardetzky O., J.* Mol. Biol., **45**, 491—511 (1969).]

При изучении спектра 3′-ЦМФ можно получить дальнейшее доказательство участия цитозинового остатка в связывании (согласно правилу 7, табл. 17-2 спектры тех участков лиганда, которые вовлечены в связывание, должны тоже изменяться). Действительно, найдено, что связывание влияет на положение линий протонов цитозинового кольца, и сдвиги одинаковы для 2′-, 3′- и 5′-ЦМФ. Это согласуется с идеей участия пиримидинового кольца в связывании, и, так как его связывание не чувствительно к положению фосфата, оно не связывается с гистидином-119.

На рис. 17-15 показана постулированная структура для комплекса с участием 3′-ЦМФ. Хотя детали могут быть неверны, она дает представление о том, какие сложные выводы могут быть сделаны по данным ЯМР.

Пример 17-Г. *Анализ характера связывания сульфанилацетамида с сывороточным альбумином быка (САБ) на основании спектра лиганда.* Спектр сульфанилацетамида состоит из большого одиночного пика метильной группы и четырех близко расположенных пиков ароматического кольца. Когда добавляется

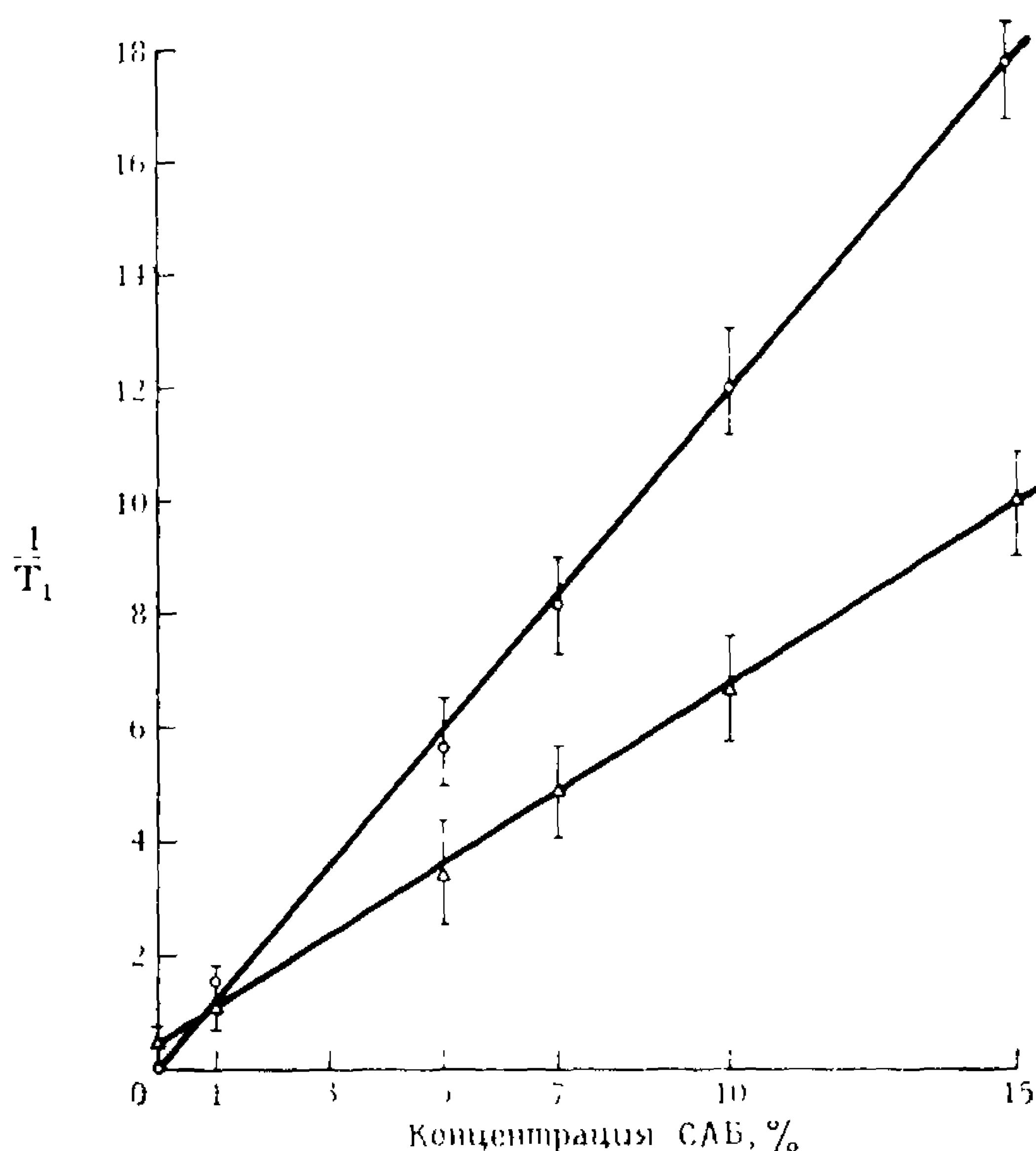


РИС. **17-16.**

Зависимость скорости релаксации ($1/T_1$) протонов сульфанилацетамида (0,1 М раствор в D_2O) от концентрации сывороточного альбумина быка (САБ): кружки соответствуют протонам *п*-аминобензолсульфонамидной группы; треугольники — протонам метильной группы. [Из работы *Jardetzky O., Wade-Jardetzky M. G.,* Mol. Pharmacol., 1, 214—230 (1965).]

САБ, ширина линий метильного и ароматических протонов существенно возрастает (рис. 17-16), что указывает на уменьшение подвижности этих протонов (табл. 17-2, правило *6*). Наиболее простое объяснение изменения ширины линии состоит в том, что увеличение вязкости раствора в присутствии белка приводит к понижению подвижности протонов. Однако это объяснение не может быть правильным, потому что, как показано на рисунке, ширина линии ароматических протонов возрастает быстрее, чем метильных протонов. Если бы уширение было исключительно следствием возрастания вязкости раствора, вызванного добавлением САБ, все линии уширялись бы одинаково; действительно, именно так и происходит, если добавляется γ-глобулин (который не связывает сульфанилацетамида). Следовательно, изменение ширины линии, возможно, является результатом избирательного связывания; так как изменение больше для ароматических протонов, ароматическое кольцо, вероятно, является главным местом взаимодействия. Отметим также, что ширина линии может слу-

жить тестом на связывание; действительно, изучение воздействия на ширину линии сульфанилацетамида концентрации как САБ, так и самого сульфанилацетамида, pH и ионной силы позволяет рассчитать константу диссоциации и таким образом определить роль ионных сил в связывании.

Пример 17-Д. *Роль кофактора в фермент-субстратном связывании.* Дрожжевая алкогольдегидрогеназа превращает этанол в ацетальдегид, но только в присутствии кофактора никотинамид-адениндинуклеотида (НАД). Изучение ЯМР приводит к пониманию роли НАД в этой реакции. Линии протонов никотинамида уширяются при смешивании фермента и НАД. Это уширение специфично к данному ферменту (т. е. с другими белками не происходит) и является, следовательно, результатом связывания кофактора с ферментом, а не эффекта вязкости, упомянутого в примере 17-Г. Если этанол (субстрат) или ацетальдегид (продукт) добавляются к смеси НАД — фермент, линии метильных протонов и субстрата, и продукта уширяются. В отсутствие фермента уширения линий не происходит, так что и субстрат, и продукт должны связываться с комплексом фермент — кофактор. Если фермент, субстрат и продукт смешиваются в отсутствие НАД, уширения линий метильных протонов этанола либо ацетальдегида не наблюдается. Следовательно, НАД должен связываться с ферментом, чтобы мог связаться субстрат.

Пример 17-Е. *Связывание полимера с белком в ДНК-гистоновый комплекс.* ДНК прочно связывается с гистонами, образуя нуклеогистон; это представляет большой интерес в связи с ролью таких образований в построении хромосомы.

Из исследований аминокислотных последовательностей известно, что в большинстве гистонов наблюдается несимметричное распределение аминокислот (т. е. аминокислоты собраны в три кластера — «основной» участок, «кислотный» участок и неполярный участок). Резонансные линии протонов аминокислот этих трех участков можно различить. Если смешать гистоны и ДНК, линии, отвечающие «основному» участку, уширяются. Это нельзя объяснить эффектом вязкости ДНК, поскольку, если бы это было так, все линии уширялись бы одинаково. Тогда можно предположить, что ДНК связывается с «основным» участком гистонов.

Изучение влияния концентрации соли на спектр ЯМР гистонов в отсутствие ДНК показывает, что с увеличением концентрации соли линии неполярных аминокислот уширяются. Это было истолковано так, что гистоны самоассоциируют посредством неполярных районов, образуя агрегаты (табл. 17-2, правила *5* и *6*). Из этого разумно предположить, что в хроматине гистоны также ассоциированы посредством неполярных групп, и в таком виде, но уже за счет основных групп связаны с ДНК.

Использование ЯМР для изучения структуры полинуклеотидов

К настоящему времени ЯМР мало использовали для изучения полинуклеотидов, отчасти потому, что (1) ДНК является настолько жесткой и имеет такой низкий коэффициент диффузии, что линии чрезвычайно широки и фактически едва наблюдаются (ее молекулярная масса намного выше предельной массы белков, изучаемых ЯМР, — 25 000); и 2) к тому времени, когда внимание исследователей ЯМР обратилось к нуклеиновым кислотам, мно-

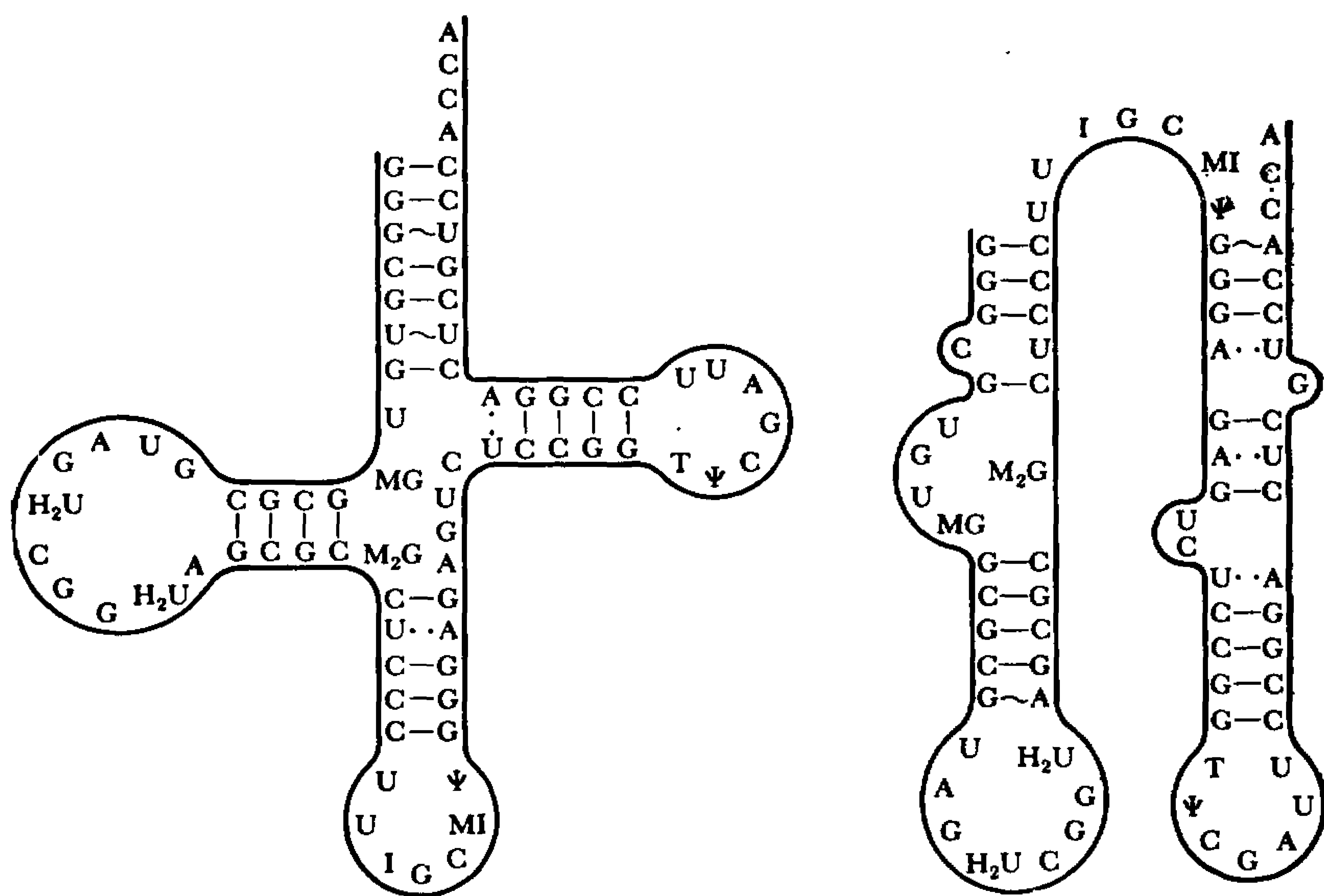


РИС. 17-17.

Две из нескольких возможных структур аланиновой тРНК дрожжей, построенные таким образом, что большая часть оснований участвует в образовании водородных связей. Водородная связь G·C-пары обозначена как —, A·U-пары — как ···; более слабые водородные связи, которые образуются в других парах оснований, обозначены как ~. С помощью метода ЯМР, позволяющего определить число пар оснований различного типа, показано, что правильной является структура клеверного листа (слева). *Символы:* G — гуанозин; C — цитидин; A — аденозин; U — уридин; I — инозин; H_2U — дигидроуридин; T — рибозилтимин; MG — метилгуанозин; M_2G — диметилгуанозин; Ψ — псевдоуридин; MI — метилинозин. [Последовательность оснований описана в работе *Holley R. W., Apgar J., Everett G. A., Madison V. T., Margeuisee M., Merrill S. H., Fenswick J. R., Zamer A.*, Science, **147**, 1462—1465 (1965).]

гие структурные особенности полирибонуклеотидов были довольно хорошо выяснены. Исключением явилось определение структуры маленького полинуклеотида — транспортной РНК (тРНК), о чем идет речь в следующем примере.

Пример 17-Ж. *Структура транспортной РНК, обусловленная спариванием оснований.* Для изучения спаривания оснований в тРНК можно использовать растворы H_2O, так как имеется два набора линий, удаленных от линий H_2O. Эти линии содержат большое количество информации. Один набор состоит из сигналов гуаниновых N-1-протонов в гуанин-цитозиновых (G·C)-парах, а другой — из сигналов урациловых N-3-протонов аденин-урациловых (A·U)-пар. Поскольку интенсивность линии пропорциональна числу присутствующих протонов, площади пиков в двух наборах указывают на число водородных связей в молекуле. Кроме того, отношение площадей двух наборов линий поглощения протонов показывает отношение G·C- и A·U-пар. Чтобы получить сведения о распределении G·C- и A·U-пар в молекуле, можно воспользоваться тем фактом, что тРНК в определенных местах может быть расщеплена ферментами, давая неперекрывающийся (дискретный) набор фрагментов, каждый из которых, очевидно, поддерживается первоначальными водородными связями. Изучая спектры фрагментов, можно определить в каждом фрагменте число G·C- и A·U-пар оснований. Следовательно, всякий раз, когда известна последовательность оснований в отдельной тРНК, возможно конструирование пространственной модели тРНК, по крайней мере с учетом только водородных связей. Один из наиболее важных выводов, который может быть сделан на основании этих исследований, состоит в том, что так называемая модель клеверного листа (рис. 17-17) правильно описывает структуру тРНК в растворе.

Введение спиновых меток

Ближайшей целью ЯМР-спектроскопии является определение расстояний либо между остатками в макромолекуле, либо между лигандом и местом связывания. Метод спиновых меток позволяет делать довольно точные измерения такого рода. Принцип, лежащий в основе метода, состоит в том, что наличие парамагнитного центра (т. е. неспаренного электрона, с которым связано очень большое флуктуирующее магнитное поле, вызванное спином неспаренного электрона) приводит к значительному уширению линий любого ядра, подвергающегося действию этого флуктуирующего поля. Уширение понижается по мере увеличения расстояния между неспаренными электронами и интересующим нас яд-

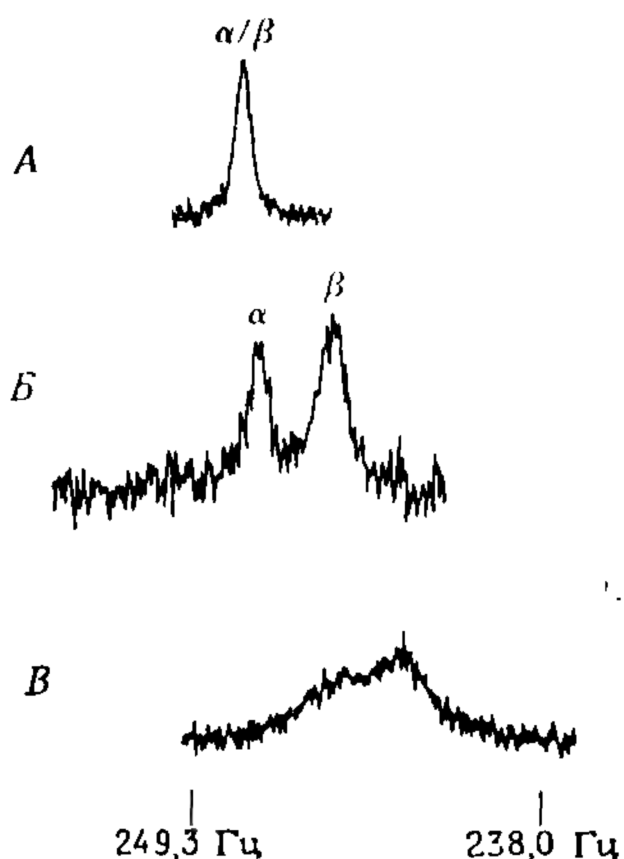


РИС. 17-18.

Сигналы протонов метильной группы N-ацетил-глюкозамина.

А — только НАГ; *Б* — НАГ плюс лизоцим; *В* — НАГ плюс спин-меченый (при N-3 His-15) лизоцим. [Перепечатано с разрешения из *Wien, Morrisett, McConnell*, Biochemistry, 11, 3707—3716 (1972). Copyright by the American Chemical Society.]

ром или по мере уменьшения времени, в течение которого ядро подвергается действию парамагнитного центра. Для протонов эффект наблюдается при расстояниях в 40 Å, для ядра ^{13}C (которое еще не было серьезно изучено с помощью метода спиновых меток) расстояние гораздо больше. На практике вещество, называемое спиновой меткой (т. е. вещество, содержащее свободный радикал), вводится в систему путем взаимодействия с определенным остатком белка или с лигандом, который связывается белком. Обычно это следующие вещества: бромацетамид, N-(DL-2,2,5,5-тетраметилпирролидинил)-мальимид и различные соединения, содержащие иминоксильную группу. С целью получения объективной информации из спектров спин-меченой системы необходимо допустить, что само по себе введение спиновой метки не влияет на конформацию макромолекулы. Обычно для проверки этого показывают, что ферментативная активность сохраняется одинаковой при изменении условий и что не меняются физические свойства. Единственное слабое место метода состоит в том, что эти критерии недостаточно надежны. Использование спиновых меток лучше всего иллюстрирует следующий пример.

Пример 17-3. *Расстояние между местом связывания и аминокислотным остатком белка.* Если гистидин-15 лизоцима ковалентно связан со спиновой меткой, содержащей иминоксильный азот, и к ферменту добавляется субстрат — N-ацетилглюкозамин (НАГ), резонанс метильных протонов ацетамидной группы НАГ становится шире, чем в отсутствие спиновой метки (рис. 17-18). С помощью простого уравнения по ширине линии можно рассчитать расстояние между неспаренным электроном иминоксильной группы и протонами, ответственными за резонанс. После введения поправки на собственную длину спин-меченого соединения можно вычислить истинное расстояние между протонами суб-

страта и гистидином-15. Определенные таким образом расстояния приблизительно на 85—95% согласуются с величинами, полученными по данным рентгеноструктурного анализа.

Фурье-спектроскопия ЯМР

Как уже объяснялось, для получения спектра на традиционных приборах ЯМР либо оставляют неизменной частоту генератора высоких частот и изменяют напряженность магнитного поля, либо фиксируют поле и изменяют частоту. Чтобы получить хорошее отношение сигнала к шуму, необходимо много раз повторять развертку и усреднять данные. Это медленный и неэффективный метод, так как в каждую единицу времени регистрируется только узкий участок спектра. Рассмотрим эффект возбуждения коротким, но очень интенсивным радиочастотным импульсом при фиксированном поле. Так как импульс на самом деле состоит из *перекрывающегося спектра частот* (математическое обоснование этого, а именно концепцию преобразования Фурье, можно найти почти в любом учебнике по волновой теории), импульс может одновременно возбуждать весь диапазон резонансных частот. Этот принцип, лежащий в основе фурье-спектроскопии ЯМР, и обеспечивает значительное техническое усовершенствование. Способ возбуждения требует существенных изменений в оснаще-

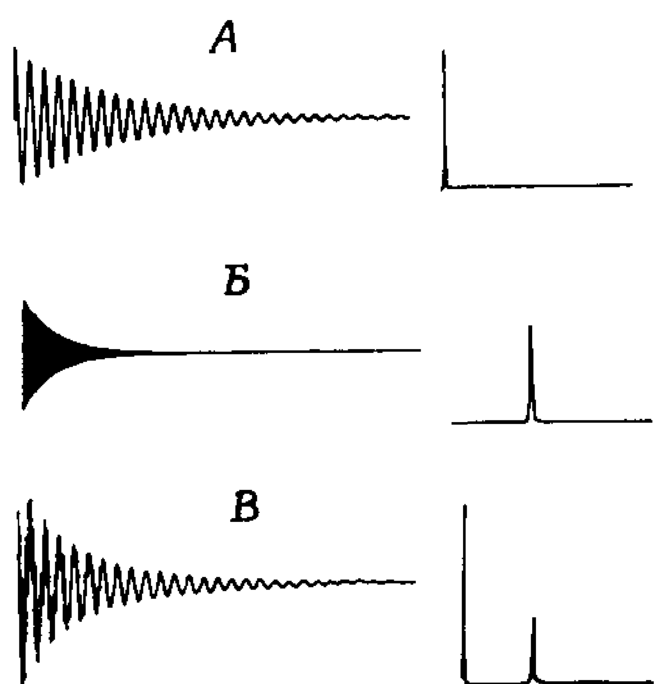


РИС. 17-19.

Сигнал, полученный на фурье-спектрометре ЯМР: слева показаны сигналы, принимаемые вычислительной машиной, справа — спектр с частотной разверткой после обработки на вычислительной машине. Параметры, на которые нужно обратить внимание, — это частота и время спада сигнала. Частота определяет положение сигнала на частотной шкале справа, а время спада определяет T_2, которое обратно пропорционально ширине полосы: *А* — низкая частота, медленный спад; *Б* — высокая частота, быстрый спад; *В* — смесь *А* и *Б*. [Из книги *Dwek R.*, Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry, Clarendon Press., 1973.]

нии приборами, поскольку, чтобы иметь спектр, полученный сигнал (рис. 17-19), необходимо расшифровать. Это делается с помощью цифрового вычислительного устройства, работающего «на линии». Детали принимающей и обрабатывающей системы слишком сложны, чтобы их здесь описывать, но они входят в коммерчески доступные инструкции по использованию аппаратуры. Снова делаются повторные развертки и, как в обычном ЯМР-эксперименте, для улучшения отношения сигнала к шуму данные усредняются; однако преимущество метода преобразования Фурье состоит в том, что требуется приблизительно одна десятая времени для получения данного отношения сигнала к шуму, что дает десятикратное увеличение чувствительности. Это означает, что, во-первых, при концентрациях, используемых в традиционном ЯМР, обнаруживаются линии, которые обычно не видны на фоне шума, и разрешение улучшается, а, во-вторых, для получения стандартной чувствительности требуется в десять раз меньшая концентрация. Возможность использования более низких концентраций ведет к двум важным последствиям: 1) можно изучать другие ядра, такие, как ^{13}C, естественное содержание которых и чувствительность низки (табл. 17-1), и 2) можно исследовать при разных концентрациях процессы, которые очень зависят от концентрации, такие, как ферментативные реакции или ассоциация полимеров. В будущем желательно, чтобы все ЯМР-эксперименты велись на приборах с фурье-преобразованием.

Использование других ядер (не протонов)

Линию резонанса может давать ядро, имеющее спин, отличный от нуля. В связи с этим, к сожалению, исключаются обычные изотопы ^{12}C и ^{16}O (эмпирическое правило гласит, что $I=0$, если и атомный номер, и массовое число четные). Второе требование заключается в следующем: естественное содержание изотопа и магнитный момент должны быть достаточно велики, чтобы сигнал можно было обнаружить (относительная чувствительность ядер приблизительно пропорциональна кубу отношения магнитных моментов). Кроме того, лучше, чтобы спин не был $>^1/_2$, поскольку для таких ядер линии очень уширяются в связи с явлением, называемым квадрупольной релаксацией (которая не будет обсуждаться).

Этим критериям удовлетворяют три ядра ^{13}C, ^{19}F и ^{31}P. Они представляют особый интерес, так как ввиду большой поляризуемости электронных облаков химические сдвиги этих ядер составляют 400, 400 и 600 м. д. соответственно. Так как эти сдвиги при-

мерно в 50 раз больше сдвигов протонов, разрешение также намного больше, и появляется возможность увидеть более тонкие различия в окружении.

Очень велики возможности изотопа ^{13}C ввиду широкого диапазона химических сдвигов, большей чувствительности к структурным изменениям и простых спектров. Из-за низкого содержания он редко соседствует с другим ^{13}C, таким обазом, редко происходит расщепление линий за счет спин-спиновых взаимодействий с ^{13}C. С помощью ^{13}C получают информацию об окружении атомов углерода, дополняя сведения по протонам. К тому же нет необходимости в D_2O, которая может иногда оказывать влияние на структуру. Однако из-за низкого естественного содержания (1%) его очень трудно обнаруживать обычными средствами. Решению этой проблемы до некоторой степени содействовало применение фурье-спектроскопии ЯМР, но чувствительность метода все еще ниже, чем в случае протонов. Окончательное решение задачи повышения чувствительности дает развитие методов обогащения ^{13}C, хотя наряду с очевидным преимуществом, которое дает обогащение, появляются трудности, связанные с расщеплением линий. Однако даже несмотря на остающуюся проблему низкой чувствительности, уже заметен вклад ЯМР-^{13}C в биохимию.

Недостаток применения изотопа ^{19}F состоит в том, что обычно он отсутствует в биологических объектах. А преимущество в том, что его можно ввести в определенные места молекулы и, следовательно, он будет играть роль внешней метки. Если число таких мест невелико, спектр состоит из небольшого количества линий. В случае белков ^{19}F используется двумя путями: 1) вводят ^{19}F в участок связывания белка и наблюдают резонанс ^{19}F в зависимости от действия различных агентов — pH, температуры, лигандов и т. д.; 2) используют фторированный лиганд и наблюдают сигнал от связанного и несвязанного лиганда. Таким образом можно изучить химический обмен, определить различные параметры связывания и получить некоторые данные о структуре места связывания. Изотоп ^{31}P, который до настоящего времени имел лишь ограниченное применение при исследовании нуклеотидов, мембран и фосфолипидов, наверняка будет более широко использоваться в будущем.

Список литературы

Becker E. D., High Resolution Nuclear Magnetic Resonance, Academic Press, 1969.

Bovey F. A., Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, Academic Press, 1969.

Bovey F. A., High Resolution Nuclear Magnetic Resonance of Macromolecules, Academic Press, 1972.

Dwek R. A., Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry, Clarendon Press, 1973.

McDonald C. C., Phillips W. D., Proton Magnetic Resonance Spectroscopy, in "Fine Structure of Proteins and Nucleic Acids", vol. 4, edited by G. D. Fasman and S. N. Timasheff, Dekker, 1970, pp. 1—48.

Roberts G. C. K., Jardetzky O., "Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Amino Acids, Pertides and Proteins", Advan Protein Chem., **24**, 448—545 (1970).

Sheard B., Bradbury E., "Nuclear Magnetic Resonance in the Study of Biopolymers and Their Interaction with Ions and Small Molecules", Progr. Biophys. Mol. Biol., **20**, 187—246 (1970).

Задачи

17-1. Сколько резонансов от протонов можно ожидать в случае (а) сжиженного метана, (б) сжиженного этана, (в) хлороформа, (г) формальдегида, (д) ацетона, (е) метанола, (ж) этанола в CCl_4?

17-2. Будет ли протонный спектр смеси фенилаланина и глицина суммой спектров каждого из них? Будет ли важна суммарная концентрация?

17-3. Объясните, почему в спектре ^{13}C, записанном в условиях полного двойного резонанса $^{13}C - \{^1H\}$, содержится меньше линий, чем в протонном спектре, и почему число линий будет возрастать по мере увеличения содержания ^{13}C.

17-4. Предположим, что вы пытаетесь определить механизм действия некоего фермента. Вы выдвигаете гипотезу, что по мере превращения в продукт субстрат дает два промежуточных соединения. Это известные соединения, но их чрезвычайно трудно идентифицировать в реакционной смеси путем стандартных химических и физических тестов. Объясните, как в этом случае может помочь ЯМР.

17-5. Предположим, что в ферменте имеется один гистидин. При добавлении субстрата каждая линия гистидина смещается на величину от 2 до 4 м. д. Можно ли однозначно утверждать, что гистидин находится в месте связывания?

17-6. При денатурации в протонных спектрах белков неизменно происходят резко выраженные изменения. Обычно меняется ширина и положение линий. Будете ли вы ожидать, что одним из изменений будет появление или исчезновение расщепления?

17-7. В обычной ферментативной реакции участвуют фермент, кофактор и молекула субстрата. Опишите ход ЯМР-эксперимента, позволяющего сделать различия между следующими возможностями: а) фермент связывает кофактор до субстрата; б) субстрат связывается с кофактором и комплекс связывается с ферментом; в) фермент связывается с субстратом, но реакция не идет до тех пор, пока не добавлен кофактор.

17-8. Каких различий можно ожидать между спектрами воды и льда? Поясните.

17-9. Какого рода спектральными изменениями будет сопровождаться димеризация белка?

17-10. Для фермента получен протонный спектр. Приблизительно для 50 линий характерны химические сдвиги, примерно в два раза отличающиеся от сдвигов, обычно наблюдаемых для белков. Кроме того, линии шире, чем те, с которыми обычно имеют дело. В чем может быть причина и как вы проверите свою гипотезу?

17-11. Следует ли ожидать заметных различий в протонном спектре линейной и кольцевой ДНК?

VI ЧАСТЬ

РАЗНЫЕ МЕТОДЫ

ГЛАВА 18

Разные методы

Эта глава содержит краткое описание разнообразных полезных методов, которые не связаны с темами, рассмотренными в других главах.

Гидродинамический сдвиг и деградация ультразвуком

Как вязкость, так и коэффициент седиментации раствора ДНК понижаются, когда раствор быстро истекает через узкое отверстие (например, подкожную иглу, пипетку с острым наконечником или вискозиметр с тонким капилляром), а также сильно перемешивается или встряхивается. Эти эффекты обусловлены разрушением молекул под действием гидродинамических сдвигающих сил.

Как было объяснено в гл. 13, если жидкость, содержащая палочкообразную молекулу, протекает через трубку, то в результате сдвигающей силы палочка будет стремиться ориентироваться и растянуться. Если молекула растянута до предела, она разорвется где-то недалеко от своей середины. Такие же сдвигающие силы могут возникнуть при интенсивном турбулентном движении или сильном встряхивании. Контролируя количество раствора, протекающего в единицу времени через узкие трубки, или скорость вращения лопастей мешалки, можно разорвать молекулу последовательно на две, четыре, восемь и т. д. частей. Как и можно было ожидать, величина критической сдвигающей силы (т. е. наименьшего напряжения сдвига, при котором молекула разрывается) понижается с увеличением молекулярной массы.

Обычно в лабораторной практике, чтобы выделить ДНК максимальной массы и сохранить размеры выделенной ДНК, стараются избежать возникновения сдвигающих сил. В табл. 18-1 суммированы результаты воздействий на ДНК с различной молекулярной массой некоторых лабораторных процедур. Отметим, что чем выше молекулярная масса, тем больше требуется осторожности.

ТАБЛИЦА 18-1

Степень разрыва двух- и одноцепочечных ДНК с различной молекулярной массой при обычных лабораторных операциях

Операция	Двухцепочечная ДНК		Одноцепочечная ДНК	
	$M\ 25 \cdot 10^6$	$M\ 106 \cdot 10^6$	$M\ 12{,}5 \cdot 10^6$	$M\ 53{,}0 \cdot 10^6$
Использование пипеток				
на 1 мл серологические пипетки	Безопасно	Безопасно	Безопасно	Безопасно
на 0,1 мл	»	Немного разрывается	»	Разрывается
Заполнение центрифужных ячеек				
иглами 22-го номера	»	Безопасно	»	»
иглами 24-го номера	»	Немного разрывается	Немного разрывается	»
Переливание	»	Безопасно	Безопасно	Разрывается при разбрызгивании
Свешивание с другим раствором	»	»	»	Разрывается, если отличаются плотности
Встряхивание	»	Разрыв при возникновении турбулентности	Разрыв при возникновении турбулентности	Разрывается
Барботирование воздуха	»	Безопасно	Безопасно, если медленно	»

Общая тенденция

1. Чувствительность к сдвигу возрастает с молекулярной массой
2. Одноцепочечная молекула более чувствительна, чем двухцепочечная молекула той же длины

Измерение величины критических напряжений сдвига можно использовать для полуколичественных аналитических определений. Например, если известно, что молекула линейна, по напряжению сдвига, которое требуется для разрыва молекулы попо-

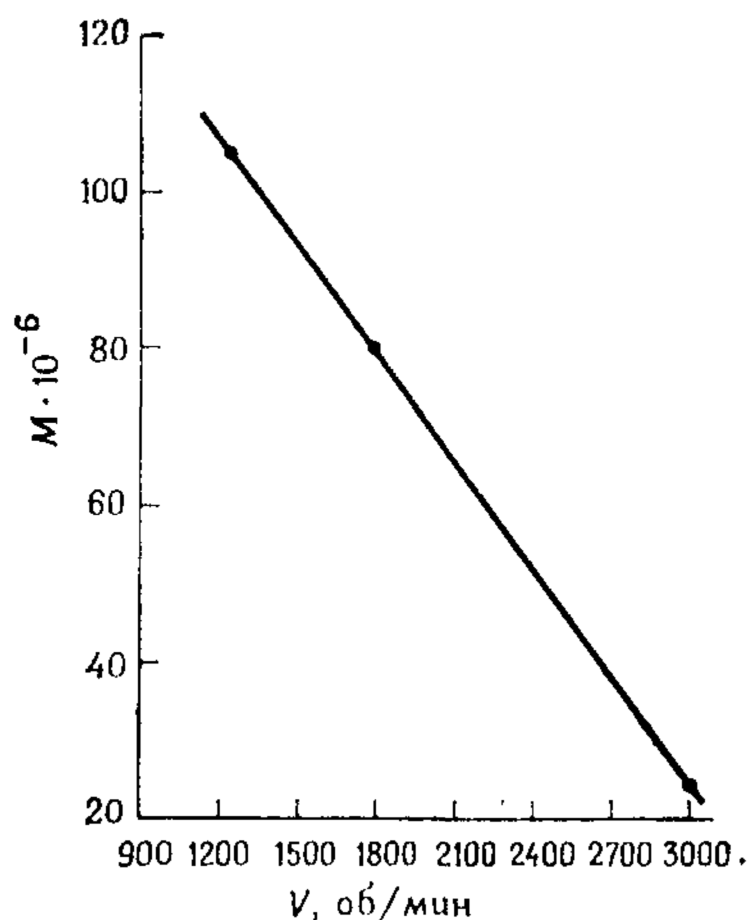


РИС. 18-1.

Типичная калибровочная кривая, устанавливающая связь между критической скоростью перемешивания *V*, вызывающей разрыв молекулы ДНК пополам, и молекулярной массой различных ДНК. Концентрация растворов ДНК составляет 20 мкг/мл в 1 *M* NaCl. Подобные кривые очень сильно зависят от концентрации, причем критическая скорость заметно понижается с уменьшением концентрации ДНК. Чтобы определить молекулярную массу, необходимо использовать ту же самую концентрацию ДНК и ту же систему перемешивания.

лам, можно оценить молекулярную массу. Важно, однако, понять, что действительную величину напряжения сдвига никогда не измеряют. Обычно делается следующее: берется серия молекул ДНК с известной молекулярной массой, их растворы перемешиваются с различными скоростями и строится зависимость самой низкой скорости, которая требуется для разрыва молекулы пополам, от молекулярной массы. В результате получается стандартная калибровочная кривая, которую можно использовать для оценки *M* образца путем измерения для этого образца критической скорости перемешивания. На рис. 18-1 приведен пример такого опыта. Калибровочную кривую можно также получить, пропуская образец через узкие трубки и строя зависимость критической скорости потока от молекулярной массы; однако методика, в которой используется перемешивание, проще.

Если молекулярная масса известна, можно установить, линейна ли молекула, потому что в случае нелинейности молекулы возникает аномальная чувствительность к сдвигу. Например, если бы вытягивали кольцевую молекулу, имеющую молекулярную массу *M*, она бы образовывала петлю длиной, равной длине молекулы с *M*/2, и была бы в два раза толще. Следовательно, ее чувствительность к сдвигу составляла бы одну четвертую величины, ожидаемой для молекулы с такой молекулярной массой (рис. 18-2).

Чтобы оценить величину молекулярной массы путем изучения сдвига, необходимо поддерживать постоянную концентрацию ДНК, потому что с возрастанием концентрации значительно увеличивается устойчивость к сдвигу («самозащита»).

Большое значение для выделения специфических участков молекулы ДНК имеет также возможность приготовления поло-

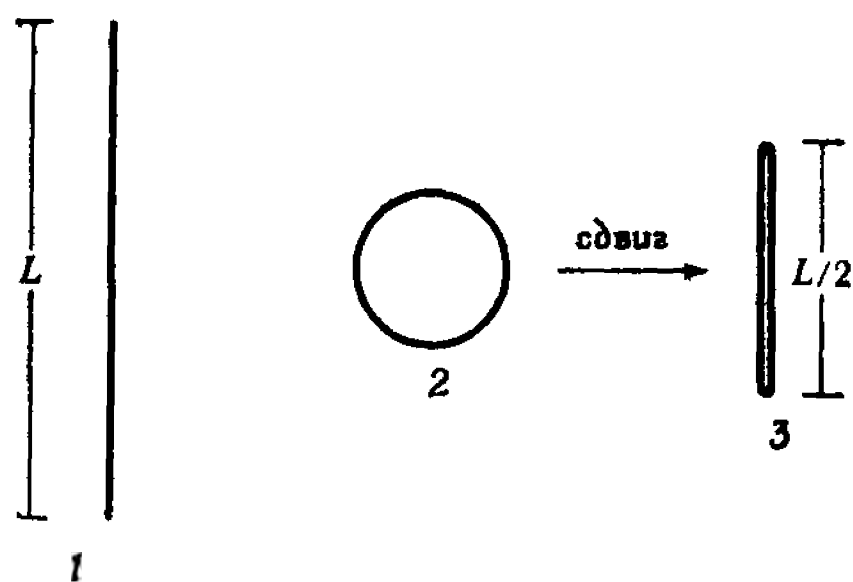


РИС. 18-2.

Действие сдвига на кольцевую молекулу. В отличие от линейной молекулы длины L (*1*) кольцевая молекула той же длины (*2*) под действием сдвига вытягивается до почти линейной структуры длиной L/2 (*3*), имеющей удвоенное число цепей.

вин, четвертей и меньших долей молекулы, так как часто эти фрагменты могут быть разделены по их плавучей плотности в растворах солей цезия (см. гл. 11).

Гидродинамический сдвиг может быть использован для разрушения больших структур, даже целых клеток. Например, один из наиболее общих методов разрушения клеток состоит в том, что их подвергают действию интенсивных звуковых полей; при этом обычно не принимают во внимание, что разрывы при озвучивании возникают за счет гидродинамического сдвига. Когда жидкость помещают в звуковое поле высокой интенсивности (либо помещая ее в объемный резонатор, либо, чаще, вводя в жидкость источник колебаний), в жидкости возникает *кавитация*, т. е. быстрое образование и схлопывание микропузырьков. Кавитация вызывается растворенными газами, выходящими в виде пузырьков из раствора. Интенсивное схлопывание этих пузырьков приводит к разрушению клеток, агрегатов молекул или макромолекул. (В чрезвычайно интенсивных звуковых полях некоторые химические соединения разрушаются, образуя свободные радикалы, которые могут быть причиной других повреждений молекул.) Не ясно, вызывает ли схлопывание пузырька турбулентность в жидкости или ее локальное ламинарное течение, но механизм разрушения, несомненно, связан с гидродинамическим сдвигом. Действительно, регулируя интенсивность звука, удавалось разрезать молекулы ДНК пополам, на четыре части и т. д. Контролируемое озвучивание редко используется в аналитических целях; оно применяется главным образом для разрушения клеток, из которых затем извлекаются внутренние компоненты. В общем, методика проста, и единственная предосторожность, которую нужно соблюдать, — это избегать нагрева. При озвучивании воде

сообщается значительное количество механической энергии, и из-за этого температура быстро поднимается. По обычной методике образцы охлаждают до температуры льда, озвучивают в течение 30 с, снова охлаждают и все повторяют. Таким путем удается поддерживать низкую температуру.

Водородный обмен

При растворении многих веществ в дейтериевой (D_2O) или тритиевой (^3H_2O)* воде происходит обмен атомов водорода на D или ^3H. Аминокислоты, нуклеозиды, короткие полипептиды, белки в конформации беспорядочного клубка и одноцепочечные нуклеиновые кислоты быстро обменивают атомы водорода, связанные с атомами азота, кислорода и серы; атомы водорода, связанные с атомами углерода, обмениваются гораздо медленнее. В белках, в силу их химических свойств, способные к обмену протоны боковых групп некоторых аминокислот (например, OH серина и NH_2 глутамина и аспарагина **) обмениваются намного быстрее, чем протоны пептидной связи или амидных групп глутамина и аспарагина. Эти два класса протонов различают по pH-зависимости скоростей водородного обмена — первый класс имеет минимум при pH 7, второй — при pH 3. Каждый класс можно подразделить по принципу степени участия протонов в образовании водородных связей. Поскольку скорость водородного обмена обычно гораздо меньше, чем скорость образования и разрыва водородных связей (которая контролирует доступ растворителя к группам, участвующим в образовании водородных связей), наблюдаемая скорость водородного обмена для любой группы есть произведение скорости собственно водородного обмена на долю времени, в течение которого группа доступна растворителю. Таким образом, если группа участвует в образовании водородной связи, то это должно приводить к понижению скорости водородного обмена. Это происходит потому, что данная группа подвергается действию растворителя только тогда, когда имеет место локальный разрыв водородных связей. Следовательно, измеряя скорости водородного обмена для открытых групп (например, в мономерах) и скорости обмена для аналогичных групп макромолекулы, можно определить в каждый данный момент времени долю групп, не участвующих в образовании водородных связей.

---

* Поскольку в описываемых здесь и далее экспериментах исследователь всегда имеет дело с относительно разбавленной тритиевой водой, ее лучше обозначать $^3H—H_2O$.— *Прим. ред.*

** По-видимому, имеются в виду NH_2-группы лизина и аргинина. — *Прим. перев.*

В двухцепочечных нуклеиновых кислотах обмен протонов, участвующих в образовании водородных связей, значительно облегчается при действии агента, который разрывает водородные связи. Резюмируя, можно сказать, что протон, потенциально способный к быстрому обмену, обменивается плохо, если он образует водородную связь. Этот факт можно использовать для определения числа водородных связей, эффективности различных денатурирующих агентов или динамического состояния макромолекулы. При первом применении этой методики рассматривали только дейтериевый обмен, потому что ^3H_2O была недоступна. Обнаружение дейтерия было очень трудной задачей, которую решали либо путем определения плотности в колонке с градиентом плотности Линдерстрема — Ланга (гл. 12), либо путем инфракрасной спектрофотометрии (гл. 14). Однако, как только стала доступной ^3H_2O, вместо дейтериевого обмена стали использовать тритиевый, поскольку ^3H легко обнаруживать по радиоактивности.

Методика тритиевого обмена, в которой используется гель-проникающая хроматография на различных молекулярных ситах (рис. 8-21), состоит в следующем. К белку или нуклеиновой кислоте в растворе H_2O добавляют тритиевую воду. Через различные промежутки времени отбирают пробы и помещают их на колонку. ^3H_2O сильно задерживается колонкой, в то время как белки и нуклеиновые кислоты быстро проходят через нее. Используя колонку такой длины, что белок или нуклеиновая кислота проходят через нее за 10 с, концентрацию несвязанного ^3H понижают приблизительно в 10^8 раз. С колонки отбирают фракции и радиоактивность каждой определяют методом сцинтилляционного счета; концентрацию белка или нуклеиновой кислоты определяют спектрофотометрически (гл. 14) или в некоторых случаях с помощью цветных реакций на белок. Следовательно, можно измерить число обменявшихся атомов водорода, приходящееся на единицу массы или на молекулу (если известна молекулярная масса) как функцию времени.

Методом ^3H-обмена получено несколько важных результатов. Например, установлено, что протоны, участвующие в образовании водородных связей двухцепочечной ДНК, обмениваются. Из данных по кинетике изотопного обмена и равновесному распределению изотопов и влиянию на них pH выяснено, что водородные связи в двухцепочечной ДНК постоянно разрушаются и образуются вновь; этот процесс назвали «дыханием» и предположили, что он лежит в основе возможного механизма таких процессов, как инициация синтеза ДНК и спаривание ДНК — ДНК при генетической рекомбинации. Второй пример — определение числа водородных связей в тРНК путем измерения доли быстро обмениваемых протонов; эти данные были использованы для подтверждения одной из предложенных структур

тРНК. Третий пример — это предпринимаемая сейчас попытка изучать кинетику перехода белка из денатурированного в нативное состояние. С этой целью определяют в нем число водородных связей как функцию времени, прошедшего с момента начала ренатурации.

Равновесный диализ

Равновесный диализ является удобным методом изучения связывания малой молекулы с макромолекулой и удобным тестом на присутствие малой молекулы. Принцип равновесного диализа состоит в следующем. Раствор макромолекул помещается внутри диализного мешка (гл. 7), как показано на рис. 18-3. Мешок подвешивается в среде, в которой в определенной концентрации содержатся малые молекулы, способные связываться с макромолекулой. Малые молекулы, свободно проникающие через стенки мембраны, диффундируют в мешок. Если бы макромолекулы отсутствовали, концентрация малых молекул внутри и снаружи мешка стала бы одинаковой. Однако в присутствии макромолекул концентрация малых молекул внутри мешка больше из-за того, что часть их связана с макромолекулами (концентрация несвязанных малых молекул внутри мешка будет всегда равна концентрации снаружи него). Измерение внутренней и внешней

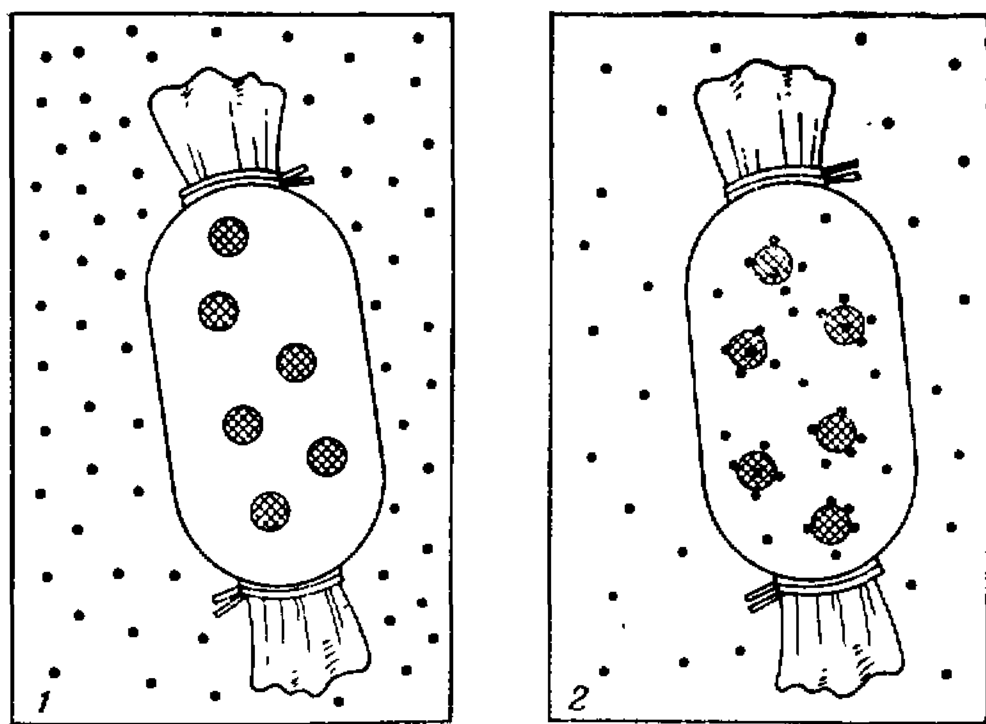


РИС. 18-3.

Равновесный диализ. Диализный мешок, в котором в начальный момент времени (*1*) находится раствор макромолекул (штрихованные кружки) помещают в раствор, содержащий способные диализоваться и связываться с макромолекулами малые молекулы (черные точки). В условиях равновесия (*2*) концентрация свободных малых молекул внутри и снаружи мешка одинакова. Так как макромолекулы связывают часть малых молекул, суммарная концентрация малых молекул внутри мешка больше, чем снаружи.

концентраций в зависимости от суммарных концентраций как малых молекул, так и макромолекул даст константу связывания k

$$k = \frac{[\text{несвязанные молекулы}] \cdot [\text{макромолекула}]}{[\text{комплекс}]},$$

где величина в скобках представляет собой концентрацию, а обозначение [несвязанные молекулы] относится к концентрации малых молекул внутри мешка. Так как [несвязанные молекулы]= =[снаружи мешка] и [комплекс]=[внутри мешка]—[несвязанные молекулы]=[внутри мешка]—[снаружи мешка], уравнение можно переписать в терминах величин, которые могут быть измерены:

$$k = \frac{[\text{молекулы снаружи}] \cdot [\text{макромолекула}]}{[\text{молекулы внутри}] - [\text{молекулы снаружи}]}.$$

Для получения надежных величин k необходимо, чтобы удовлетворялись некоторые условия: 1) неспецифическое связывание лиганда и макромолекулы с самим диализным мешком должно быть небольшим и, лучше всего, поддающимся измерению; 2) связывание должно быть сильным, иначе из-за ниже описываемого эффекта возможно получение отрицательного связывания (что, конечно, не имеет смысла). Этот эффект состоит в следующем: при больших концентрациях достаточно крупных макромолекул их объем составляет относительно большу́ю долю внутренней части диализного мешка, и, если макромолекулы не связывают лиганд, его концентрация внутри диализного мешка окажется заметно меньше внешней концентрации лиганда, так как он может свободно распределяться не во всем внутреннем объеме, а лишь в части его, не занятой макромолекулами. Следовательно, связывание должно быть всегда достаточно большим, чтобы можно было пренебречь этим отрицательным эффектом.

Хотя равновесный диализ является ценным методом определения параметров связывания, он может быть, кроме того, использован и в качестве аналитического инструмента при *обнаружении* белков, связывающих малые молекулы. Такой подход был использован в классических опытах Вальтера Гилберта по выделению Lac-репрессора *E. coli*. Так как Lac-репрессор связывает индуктор изопропилтиометилгалактозид (ИПТМГ), то после того, как клеточные экстракты были фракционированы, с помощью равновесного диализа была исследована способность различных фракций связывать ИПТМГ. Используя этот прием, с помощью различных методов разделения была выделена фракция с максимальной степенью связывания ИПТМГ, и таким образом Lac-репрессор был выделен и очищен.

Гибридизация одноцепочечных полинуклеотидов

Если двухцепочечная ДНК денатурирована, индивидуальные цепи полинуклеотидов расходятся (гл. 1). При низкой ионной силе (например, 0,01 *М*) отрицательно заряженные фосфатные группы углеводофосфатной цепи отталкиваются одна от другой. Следствием этого являются два эффекта: 1) две различные нити не могут контактировать из-за взаимного электростатического отталкивания и 2) каждая нить стремится принять максимально вытянутую и относительно жесткую конформацию, так как все части остова отталкиваются одна от другой. Значит, при низкой ионной силе основания двух нуклеотидов никогда не сблизятся настолько, чтобы образовались водородные связи. Если бы ионная сила внезапно возросла (например, до 0,5 *М*), заряд фосфатных групп был бы частично экранирован и нити быстро приняли бы конформацию беспорядочного клубка. Однако в отсутствие отталкивания зарядов вновь образуются водородные связи, т. е. связи между гуанином и цитозином и между аденином и тимином (для ДНК) или аденином и урацилом (для РНК). Вследствие гибкости длинных полинуклеотидных нитей возможность образования внутрицепочечных (в той же самой нити) водородных связей, если концентрация не очень высока, больше, чем межцепочечных (различные нити). При этом проявляется следующая тенденция: внутрицепочечные водородные связи, как правило, образуются между очень короткими комплементарными последовательностями оснований (рис. 18-4), вследствие того, что в одной цепи не часто можно найти длинные комплементарные последовательности. По стерическим причинам не все основания будут образовывать водородные связи, и это находит свое отражение в том факте, что D_{260} ДНК не восстанавливается до первоначальной величины, характерной для нативной ДНК (рис. 18-5, *А*). Так как участки, скрепленные водородными связями, очень коротки, их термическая стабильность низка, и они могут быть разрушены при значительно более низких температурах, чем те, которые требуются для денатурации нативной ДНК (рис. 18-5, *Б*). Следовательно, ДНК с внутрицепочечными водородными связями может быть превращена в одноцепочечный беспорядочный клубок при таких температурах и в условиях такой ионной силы, когда нативная ДНК была бы устойчива, и можно ожидать, что если есть время, достаточное для того, чтобы комплементарные одиночные цепи нашли друг друга, вновь образуется нативная ДНК. Так и происходит на самом деле, и этот процесс называется *ренатурацией* или *отжигом* (рис. 18-5,*В*). Двухтяжевая молекула не обязательно должна состоять из двух

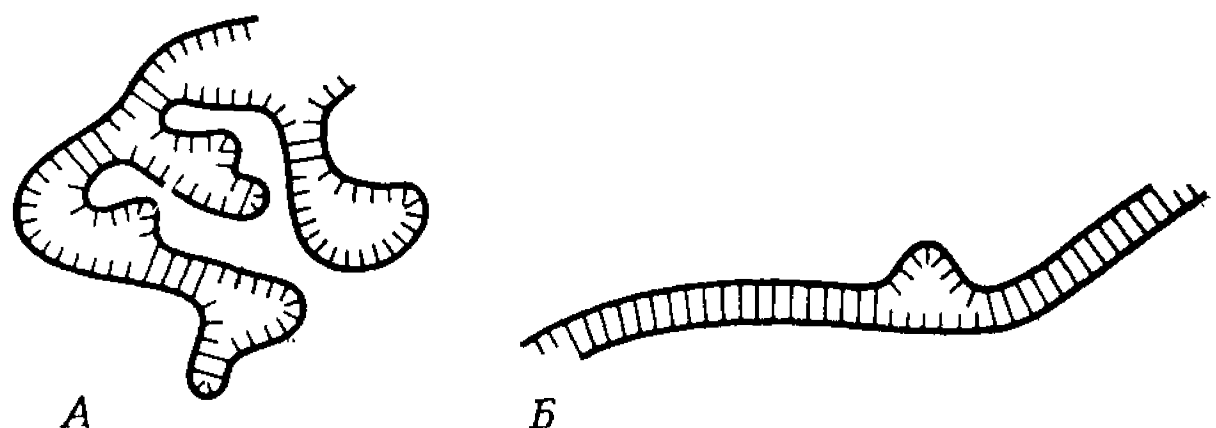


РИС. 18-4.

А — самоструктурированная одноцепочечная ДНК. В образовании комплементарных пар участвуют основания, находящиеся в различных участках цепи, что делает структуру очень компактной; *Б* — ренатурированная ДНК с одним коротким некомплементарным участком.

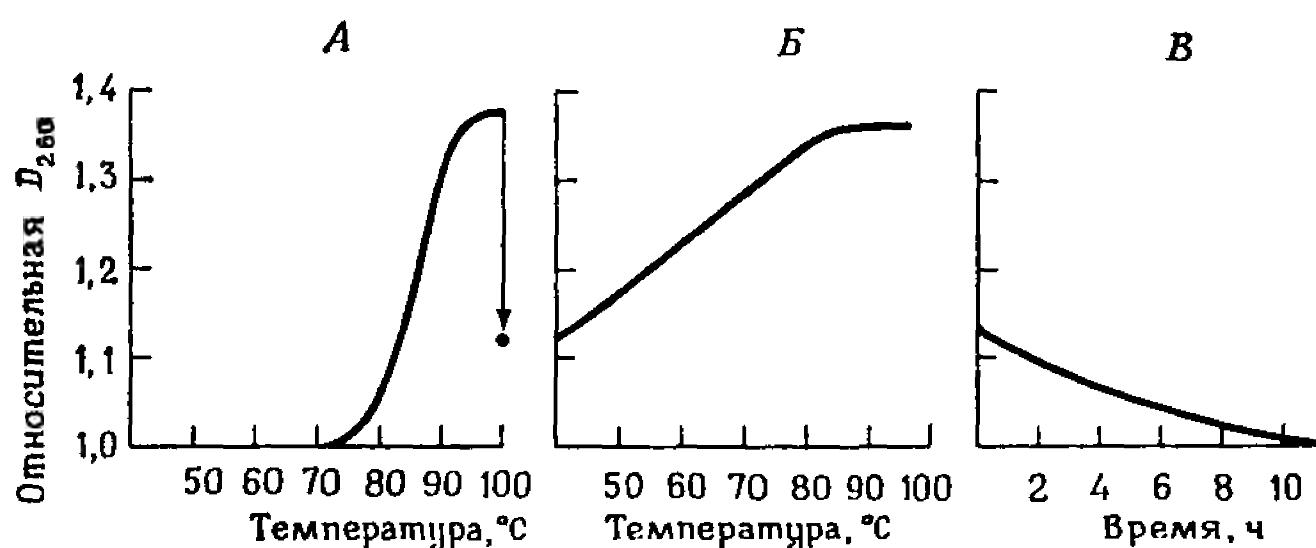


РИС. 18-5.

А — зависимость D_{260} ДНК от температуры в условиях высокой ионной силы. После достижения 100°С температуру понизили до 20°С. D_{260} падает, как показано до величины 1,12. *Б* — ДНК, которая была нагрета до 100°С и охлаждена до 20°С, нагрели снова и получили кривую зависимости D_{260} от температуры; изменение *D* теперь происходит в более широком интервале температур. *В* — ДНК, которую использовали в части *Б*, нагревали до 88°С и охлаждали в течение указанных промежутков времени. Уменьшение D_{260} указывает на образование все более совершенного дуплекса (ренатурацию).

комплементарных цепей одинаковой природы, так как одна цепь может быть ДНК, а другая — РНК, а некоторые участки (от одной пары оснований до достаточно протяженных последовательностей) могут быть и не комплементарны (рис. 18-4, *Б*). Процесс, при котором из неодинаковых цепей образуется двухтяжевая молекула, обычно называют *гибридизацией*, хотя термины «ренатурация» и «гибридизация» взаимозаменяемы. Далее следует описание методик, применяемых для обнаружения гибридизации, и одновременно приводится несколько примеров их использования.

Обнаружение гибридизации с помощью равновесного центрифугирования в растворе хлорида цезия

Эта методика теперь редко используется, но одно время она была настолько распространена, что заслуживает краткого упоминания. При приготовлении гибридов ДНК—РНК учитывали тот факт, что в случае полинуклеотидов с приблизительно 50%-ным G·C-составом плотности* ДНК и РНК в CsCl отличаются приблизительно на 0,1 г/см^3 (очень большое различие). Следовательно, денатурированную и ренатурированную смеси можно было центрифугировать до достижения равновесия в растворе CsCl и обнаружить гибридизацию по появлению полосы при соответствующей плотности. Для гибридов ДНК—ДНК, содержащих ДНК из одного и того же вида организмов, обычно используют различия в плотности между ДНК, меченной ^{15}N, ^{2}H или ^{13}C, и ДНК, содержащей только ^{14}N, ^{1}H и ^{12}C. Если бы ДНК были из различных организмов и имели различный G·C-состав, характерные для этих ДНК плотности были бы неодинаковы и гибрид можно было бы обнаружить по появлению полосы, указывающей на ДНК с промежуточной плотностью (рис. 18-6). Отметим, что при использовании этой методики, гибридизацию ДНК проводят в растворе.

Гибридизация на нитроцеллюлозных фильтрах

Если пропускать растворы с высокой ионной силой, содержащие одноцепочечную ДНК, через нитроцеллюлозные фильтры, то ДНК ими задерживается (гл. 7). Если фильтры затем высушить в вакууме, ДНК связывается настолько прочно, что ее нельзя отмыть даже при высокой температуре и низкой ионной силе. С этими связанными молекулами ДНК могут затем гибридизоваться комплементарные одноцепочечные ДНК. При этом тотчас возникает следующая проблема: добавленные одноцепочечные молекулы будут, конечно, связываться фильтрами независимо от того, находится ли уже на фильтрах ДНК. Чтобы избежать этого осложнения, фильтры, после того как с ними связали ДНК, можно подвергнуть различным обработкам, в результате которых уже невозможно связывание одноцепочечных полинуклеотидов. Примером такой обработки является промывание фильтра раствором сывороточного альбумина быка, который, по-видимому, насыщает места связывания ДНК. После того как фильтры приготовлены и соответствующим образом обработаны, добавляется небольшой объем раствора радиоактивной одноцепочечной ДНК

* Имеются в виду плавучие плотности.— *Прим. перев.*

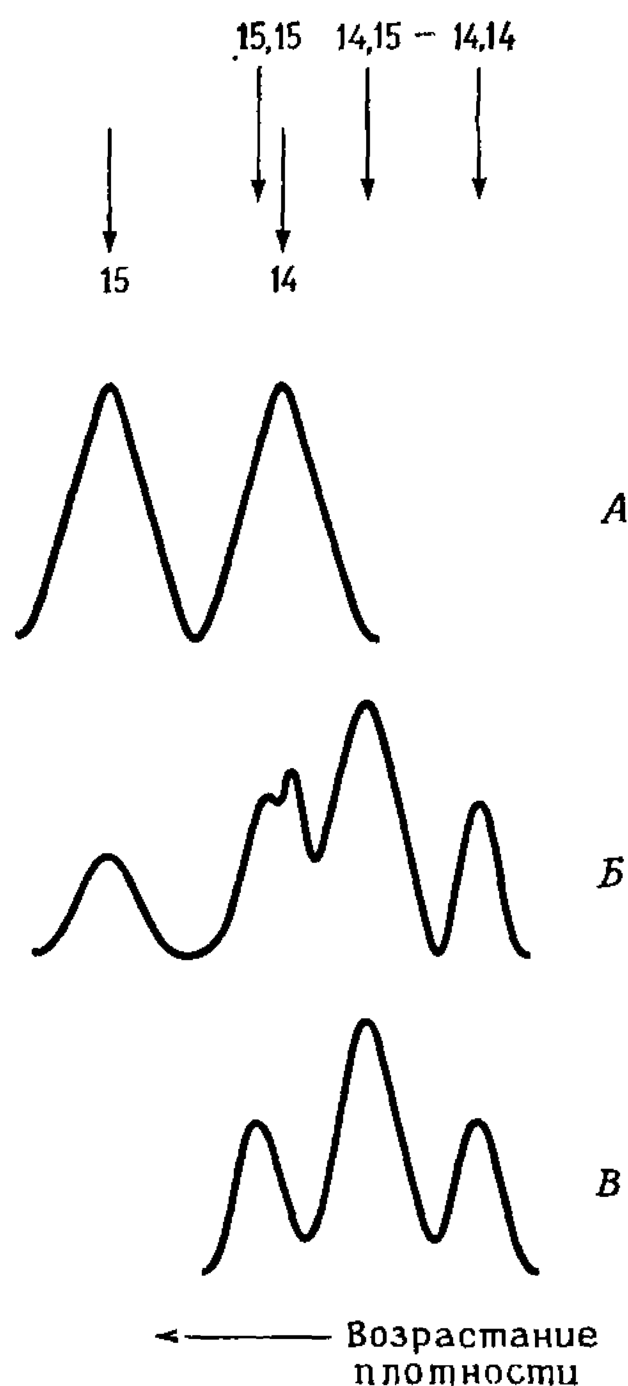


РИС. 18-6.

Обнаружение гибридизации путем равновесного центрифугирования в CsCl (гл. 11). Кривые представляют собой фотометрические диаграммы УФ-абсорбционных фотографий, показывающие распределение концентраций ДНК в центрифужной ячейке.

А — смесь денатурированной ДНК фага T7, содержащей ^{14}N и ^{15}N; *Б* — после ренатурации образца, анализ которого показан в части *А* (отметим, что имеется пять пиков: три ренатурированной ДНК и два — неренатурированной ДНК); *В* — после обработки образца, анализ которого показан в части *Б*, экзонуклеазой, специфичной к одноцепочечной ДНК, осталась только ренатурированная ДНК. Места расположения одноцепочечной ДНК, содержащей ^{14}N и ^{15}N, указаны стрелками, помеченными, соответственно 14 и 15; места расположения двухцепочечной ДНК, содержащей ^{15}N, и гибридной с ^{14}N указаны стрелками, помеченными, соответственно 14,14; 14,15 и 15,15.

или РНК и смесь инкубируется в условиях, необходимых для гибридизации, т. е. в условиях высокой ионной силы и температуры от 65 до 70°С. Комплементарная радиоактивная ДНК или РНК связывается с ДНК на фильтре (рис. 7-4). Фильтр затем промывается для удаления негибридизованного материала и высушивается. Количество гибридизованной НК определяют радиометрически.

Примеры использования гибридизации

Следующие примеры иллюстрируют использование гибридизации как в аналитических, так и в препаративных целях.

Пример 18-А. *Оценка генетического родства между организмами.* Под генетическим родством между двумя различными организмами подразумевается наличие у них участков ДНК, полностью или частично гомологичных, т. е. имеющих некоторые достаточно протяженные идентичные или почти идентичные последовательности оснований. Для выявления этого готовят нитроцеллюлозные фильтры, содержащие одноцепочечную ДНК организма А. Затем к ним добавляют радиоактивные фрагменты одноцепочечной ДНК с низкой молекулярной массой (такие фрагменты обычно получают путем озвучивания ДНК) из организма Б и дают возможность пройти гибридизации. Молекулярная масса фрагментов ДНК Б мала, так что большая их часть не будет связана из-за того, что только небольшой участок ДНК имеет гомологию. Доля ДНК Б, связывающейся с фильтром, является мерой содержания в ней последовательностей, которые являются общими для организмов А и Б. Наблюдаемую величину содержания последовательностей необходимо скорректировать, учитывая эффективность гибридизации. Обычно это делают, добавляя одноцепочечную ДНК А (меченную другим радиоактивным изотопом) и определяя долю связавшихся молекул. Следовательно, доля молекул ДНК Б, которые гомологичны молекулам ДНК А, есть (доля связанных молекул Б)/(доля связанных молекул А). Полноту гомологии можно оценить по термической стабильности гибридизованной ДНК, используя для этого некоторые уравнения, полученные эмпирическим путем.

Этот метод может быть также использован для измерения содержания ДНК определенного типа. Например, предположим, что бактериофаг инфицирует бактерию-хозяина в радиоактивной среде роста, так что обе вновь синтезированные ДНК — фаговая и бактериальная — несут метку. Доля метки, принадлежащей ДНК фага, может быть определена путем гибридизации смеси на фильтрах, содержащих ДНК фага. Как и в примере 18-А, здесь необходимо сделать поправку на эффективность гибридизации.

Пример 18-Б. *Очистка информационной, или матричной, мРНК.* Если бактериофаг инфицирует бактерию в среде роста, содержащей ^3H-уридин, синтезируются радиоактивные фаговая и бактериальная мРНК. Если выделить РНК и гибридизовать на фильтрах, содержащих одноцепочечную фаговую ДНК, с фильтрами будет связываться только фаговая мРНК. При промывании фильтров уйдет вся бактериальная мРНК, поскольку

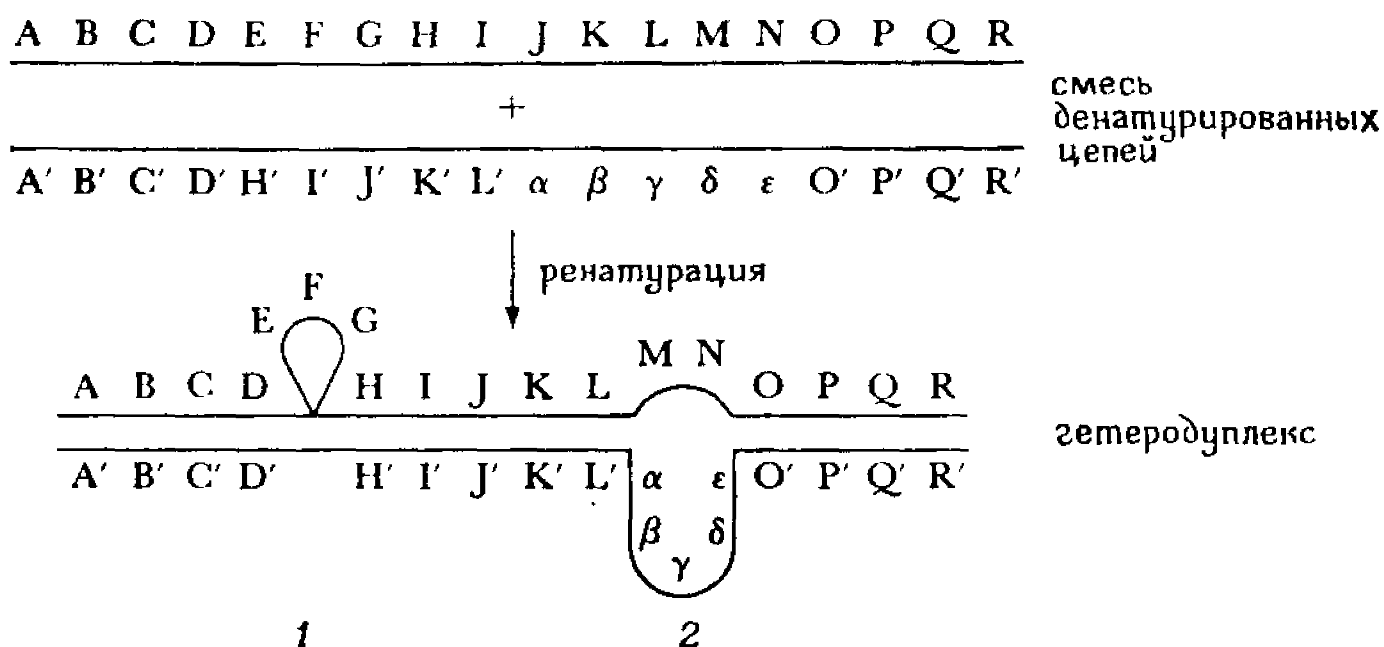


РИС. 18-7.

Схема анализа гетеродуплекса.

Две различные денатурированные цепи ДНК ренатурируют. Между комплементарными основаниями (например, AA′) вновь образуются водородные связи. Участки ДНК, для которых не находится комплементарных участков (например, EFG, MN и αβγδε), образуют петли. Отметим, что имеется два различных типа петель. В петле типа *1* содержится один фрагмент одноцепочечной ДНК; она получается в случае истинной делеции. В петле типа *2* содержится два фрагмента одноцепочечной ДНК; она получается, когда в каждой цепи в одном и том же участке содержится различная последовательность.

она не связывается с ними. Если поместить промытый фильтр в буфер и нагреть его до температуры, при которой происходит денатурация гибрида ДНК—РНК, мРНК будет десорбироваться с фильтра, перейдет в буфер. Таким образом мРНК может быть выделена и очищена.

Пример 18-В. *Идентификация ДНК, являющейся матрицей для мРНК.* Если мРНК, очищенную, как описано в примере 18-Б, гибридизовать с ДНК, в которой произошло выпадение некоторых последовательностей (генетическая делеция), и затем обработать гибрид РНазой, чтобы расщепить несвязанную РНК, количество связанной РНК будет уменьшаться, если мРНК была считана частично с участка, в котором имелись делеции. Таким образом можно идентифицировать последовательности в ДНК, соответствующие мРНК.

Пример 18-Г. *Физическое картирование генетических делеций методом электронно-микроскопического анализа.* Если гибридизовать две одноцепочечные молекулы ДНК, в одной из которых имеются делеции определенных последовательностей, будет происходить обычное спаривание оснований, за исключением того, что последовательностям в нормальной ДНК, соответствующим делециям, будет не с чем образовывать водородные связи. Следовательно, в результате получится двухцепочечная структура, имеющая ту же длину, что и ДНК с делециями, но содержащая в месте делеции петлю, длина которой соответствует длине

делецированной последовательности. Такие гибриды готовят в растворе, и они могут быть изучены методом электронной микроскопии. По расположению и относительной величине петли можно физически картировать делецию относительно концов нормальной ДНК (рис. 18-7). Более детально этот метод описан в гл. 3 (рис. 3-16).

Концентрирование растворов макромолекул

В процессе выделения и очистки макромолекул растворы часто становятся очень разбавленными, и возникает необходимость их концентрирования. Простая методика состоит в концентрировании растворов путем центрифугирования, но часто коэффициент седиментации (гл. 11) слишком мал и эта методика не эффективна. Имеется много других удачных методик, шесть из которых здесь описываются.

Высаливание с помощью сульфата аммония

Заряженные макромолекулы в растворе (например, макромолекулы в полярных растворителях) сольватированы и вследствие этого растворимы. Если создать высокую концентрацию электролитов, ионы настолько прочно связывают молекулы растворителя, что те не могут сольватировать находящиеся в растворе макромолекулы. Следовательно, макромолекулы «уходят» из раствора. Этот процесс, называемый высаливанием, лежит в основе удобной методики осаждения таких макромолекул, как белки.

В частности, для большинства, если не для всех белков, существует предельная концентрация сульфата аммония (высокорастворимого, очень чистого и недорогого реагента), выше которой белок выпадает в осадок *. Следовательно, к раствору белка может быть добавлен твердый $(NH_4)_2SO_4$, пока не произойдет осаждения. Осадок собирают путем центрифугирования и затем снова растворяют в меньшем объеме любого требуемого буфера. Этот довольно общий метод непригоден, если суммарная концентрация первоначального раствора слишком низка.

Как высаливание, так и центрифугирование основываются на удалении вещества из раствора. В основе описываемых ниже методов лежит удаление воды.

* Предельное количество сульфата аммония различно для каждого белка, так что, варьируя его, можно фракционировать смесь белков.

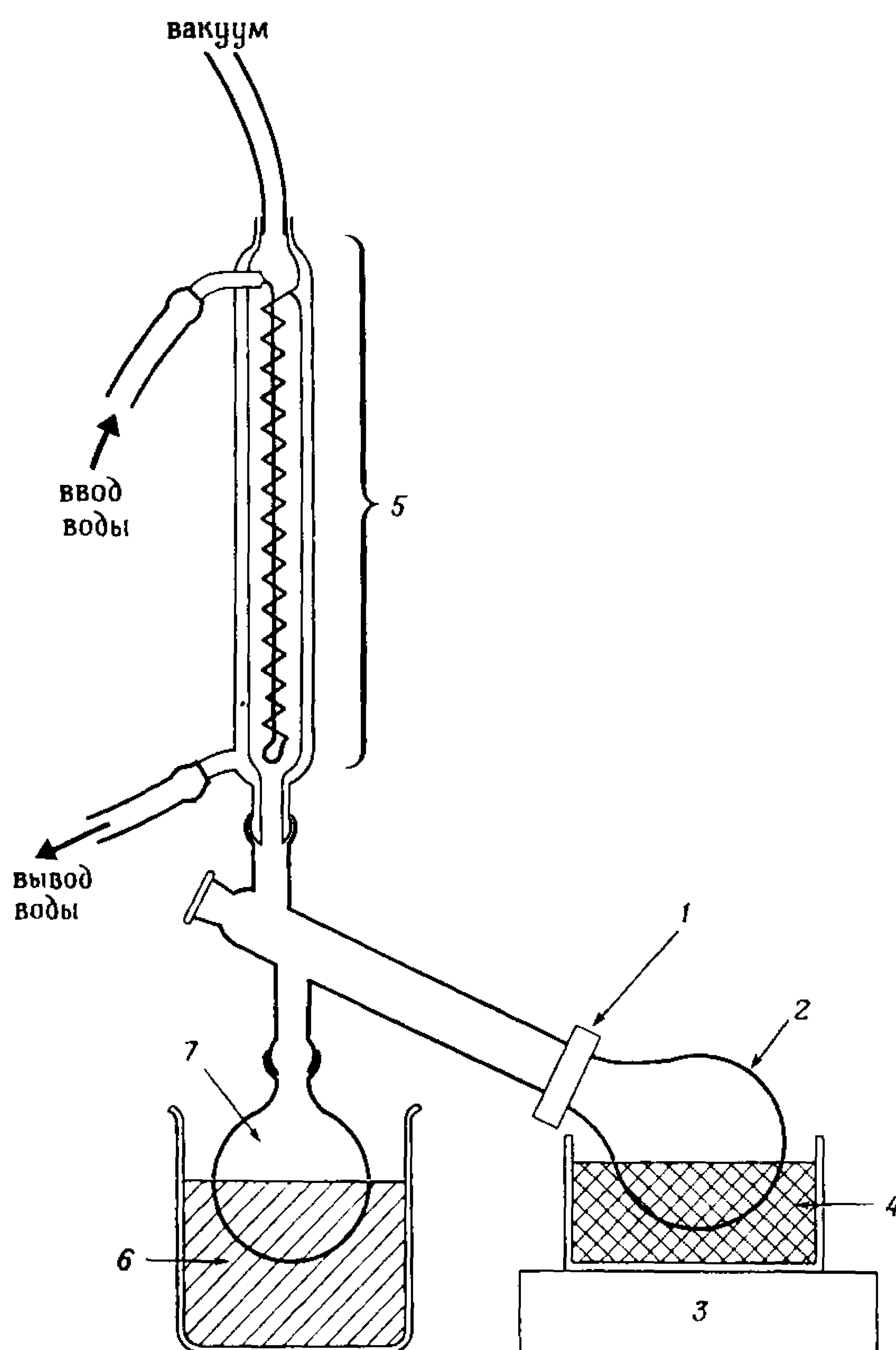


РИС. 18-8.

Устройство роторного испарителя.

Образец находится во вращаемой ротором *1* колбе *2* на водяной бане *4*, обогреваемой нагревателем *3*. Вся система вакуумирована. Пары растворителя конденсируются в холодильнике *5*, жидкость стекает в охлаждаемую смесью сухой лед — ацетон *6* ловушку *7* и там замерзает. Специальная перегородка (не показана) предотвращает попадание сконденсировавшейся жидкости назад, во вращающуюся колбу.

Упаривание на роторном испарителе

Согласно этой методике, раствор помещают в быстро вращающуюся колбу, из которой затем откачивают воздух (рис. 18-8). При вращении жидкость образует относительно тонкую пленку, что приводит к значительному увеличению отношения поверхности к объему упариваемой жидкости. Это резко увеличивает скорость испарения. Пары воды конденсируются на холодильнике и стекают в колбу-приемник. Благодаря вакууму система заполнена почти исключительно парами воды, что и обусловливает ин-

тенсивное упаривание раствора уже при комнатной температуре. Таким путем можно удалить воду, не подвергая молекулы действию температур, которые могли бы вызвать денатурацию или диссоциацию.

Лиофилизация

В основе этой методики лежит тот факт, что при достаточно низком давлении лед интенсивно возгоняется. Раствор образца замораживают и подвергают действию высокого вакуума. Отметим, что как лиофилизация, так и упаривание на роторном испарителе могут быть использованы для концентрирования растворов, содержащих небольшие молекулы, если они нелетучие.

Диализ под давлением

В гл. 7 были описаны полупроницаемые перегородки (например, Diaflo и Pellicon), через которые проходят малые молекулы и не проходят макромолекулы. Если раствор поместить в камеру, одна из стен которой представляет собой такую мембрану, скорость прохождения малых молекул (включая воду) через мембрану возрастает с увеличением давления. Следовательно, когда камера находится под давлением, вода проталкивается через мембрану и макромолекулы концентрируются (рис. 18-9).

Обратный диализ

Если поместить раствор в диализный мешок и мешок оставить на воздухе, вода из него испарится и раствор сконцентрируется. Если мешок окружен сухим высокорастворимым полимером, который не может проходить через мембрану, вода будет стремиться «покинуть» мешок, чтобы растворить сухой полимер. Этот процесс протекает быстрее, чем сушка на воздухе. Материал, который наиболее часто используется в качестве «внешнего» полимера,— полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Разновидностью этой методики является другая методика, связанная с применением универсального концентратора Minicon, выпускаемого корпорацией Amicon. Образец помещают в камеру, схематически изображенную на рис. 18-10. Проницаемая мембрана поддерживается прокладкой абсорбента. Вода и соли проходят через мембрану в прокладку до тех пор, пока объем образца станет таким, что он будет контактировать только с непроницаемой перегородкой. Это обычно приводит к концентрированию раствора в двадцать раз.

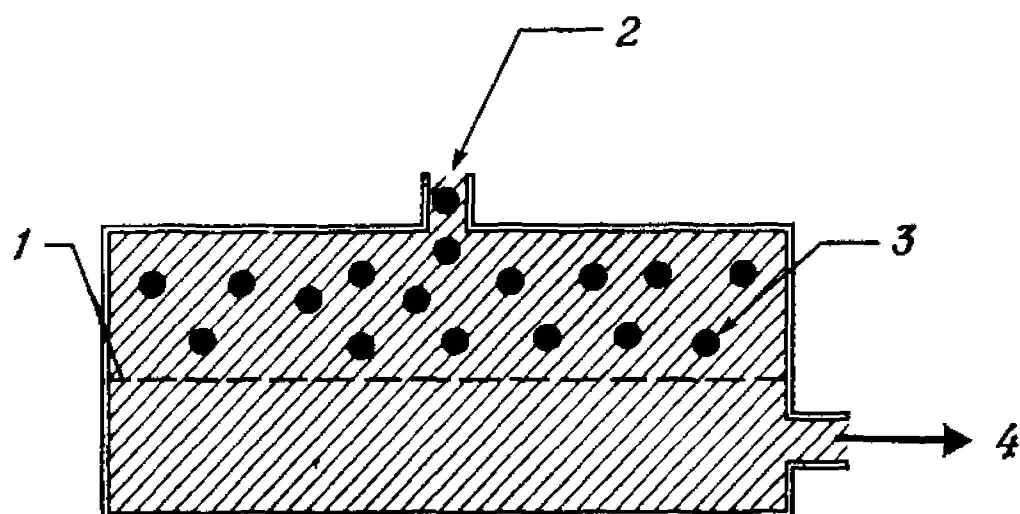


РИС. 18-9.

Концентрирование макромолекул с использованием мембран Diaflo или Pellicon. Растворитель и небольшие растворенные молекулы проходят через мембрану, а макромолекулы не проходят и, следовательно, концентрируются.

1 — мембрана; *2* — раствор под давлением газа или подаваемый центробежным насосом; *3* — макромолекулы, которые не могут пройти через мембрану; *4* — выход растворителя.

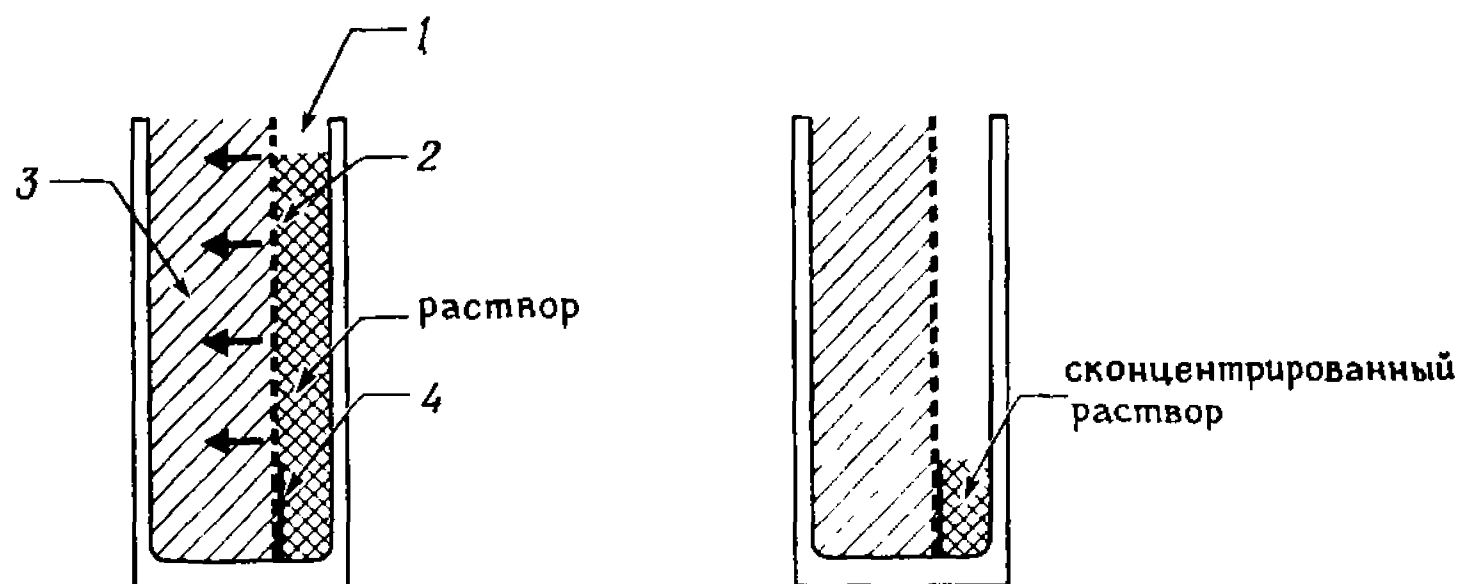


РИС. 18-10.

Схема устройства концентратора Minicon.

Образец помещается в правое отделение *1*. Жидкость проходит через мембрану *2* и поглощается абсорбентом *3*, находящимся в левом отделении. Когда уровень жидкости достигает непроницаемой перегородки *4*, концентрирование заканчивается.

Мембраны из полых волокон

Скорость удаления жидкости при диализе под давлением (см. выше) возрастает с увеличением отношения поверхности к объему. Если раствор содержится в полых пористых волокнах (рис. 7-10), отношение поверхности к объему становится огромным. Приспособления такого рода (известные под коммерческим названием Bio-Fiber, изготовляемые фирмой Bio-Rad) состоят из пучка полупроницаемых полых волокон, прикрепленных к входному и выходному каналам. В волокне создается давление и растворитель проходит через его стенку, а остающийся раствор макромолекул концентрируется.

Разделение путем распределения между растворами декстрана и полиэтиленгликоля

Водные концентрированные растворы полисахарида — декстрана и полиэтиленгликоля не смешиваются. Многие биологические полимеры, компоненты клеток и даже клетки заметно различаются по растворимости в этих двух растворах и, следовательно, могут быть разделены путем распределения между указанными растворами. Согласно стандартной методике, образец добавляют либо к раствору декстрана, либо полиэтиленгликоля, прибавляют другой раствор, встряхивают для полноты перемешивания и за-

ТАБЛИЦА 18-2

Примеры разделения и концентрирования путем распределения[a]

Распространенные системы растворителей	Факторы, влияющие на разделение
Декстран и полиэтиленгликоль	Ионная сила и pH
Декстран и оксипропилдекстран	Ионная сила
Декстран и метилцеллюлоза	pH
Сульфат декстрана и полиэтиленгликоль	Отдельные ионы
Сульфат декстрана и метилцеллюлоза	Температура
Разделяемые вещества	
Нативная и денатурированная ДНК	
Ковалентнозамкнутая кольцевая ДНК и ДНК с разомкнутым циклом или линейная ДНК	
Нативные и денатурированные белки	
Различные белки (используются при очистке ферментов)	
Белок и нуклеиновая кислота ДНК и РНК	
Различные полинуклеотиды	
Вирус и комплекс вирус—антитело	
Различные вирусы и фаги	
Различные микроорганизмы	
E. coli мужского и женского пола	
Различные виды *Chlorella*	
Различные полиовирусные штаммы	
Интактные и разрушенные хлоропласты	
Эритроциты различных видов животных	
Лимфоциты, лейкоциты и тромбоциты	
Споры и клетки	
Инсулин-секретирующие гранулы и частицы кислой фосфатазы из β-клеток поджелудочной железы	

[a] *Albertson P. A.*, Partition of Cell Particles and Macromolecules, Wiley-Interscience, 1971, and *Albertson P. A.*, Advan. Protein. Chem., 24, 309—341 (1970).

тем дают возможность двум фазам разделиться. В табл. 18-2 приведен список многочисленных веществ, которые были разделены с помощью этого метода.

Двойное лучепреломление в потоке

Как объяснялось в гл. 13, удлиненные макромолекулы могут быть ориентированы в потоке жидкости под влиянием градиента скорости течения; чем больше осевое отношение (отношение длины к ширине), тем более легко ориентируются молекулы. Как объяснялось в гл. 2, ориентированные молекулы обнаруживают свойство двойного лучепреломления, т. е. они способны поляризовать свет. Когда двойное лучепреломление возникает за счет ориентации молекул под действием градиента скорости течения, оно обычно называется двойным лучепреломлением в потоке. Можно измерить величину двойного лучепреломления как функцию градиента скорости, и это дает возможность определить коэффициент вращательной диффузии — параметр, из которого можно рассчитать осевое отношение.

Рассмотрим вискозиметр Куэтта (гл. 13) с неподвижным внутренним и вращающимся внешним цилиндрами. Между этими цилиндрами имеется зазор, который можно увидеть, если посмотреть вдоль оси прибора. Если между источником света и прибором расположен поляризатор, и выходящий свет попадает на второй поляризатор (анализатор), ось которого перпендикулярна оси первого поляризатора, свет не достигает наблюдателя. Если в зазор помещен раствор, содержащий удлиненные молекулы, и внешний цилиндр вращается, за счет градиента скорости молекулы ориентируются и изменяют плоскость поляризации света, пропущенного поляризатором, так, что некоторое количество света начинает проходить через анализатор. Однако, так как система обладает цилиндрической симметрией, имеется два района, в которых средняя ориентация оптической оси среды параллельна направлению поляризатора (рис. 18-11). В этих точках (которые находятся друг против друга) не происходит переориентации поляризованного света и анализатор не пропускает свет. Аналогично имеется два района, в которых молекулы ориентированы в направлении анализатора, и снова через всю систему свет не проходит. Следовательно, как показано на рис. 18-11, образуются четыре района, которые кажутся темными на светлом фоне. Такая фигура называется крестом, а угол χ — *углом экстинкции*. Можно показать, что

$$\chi = 45^\circ - \frac{15G}{\pi\Theta} + \cdots, \quad (1)$$

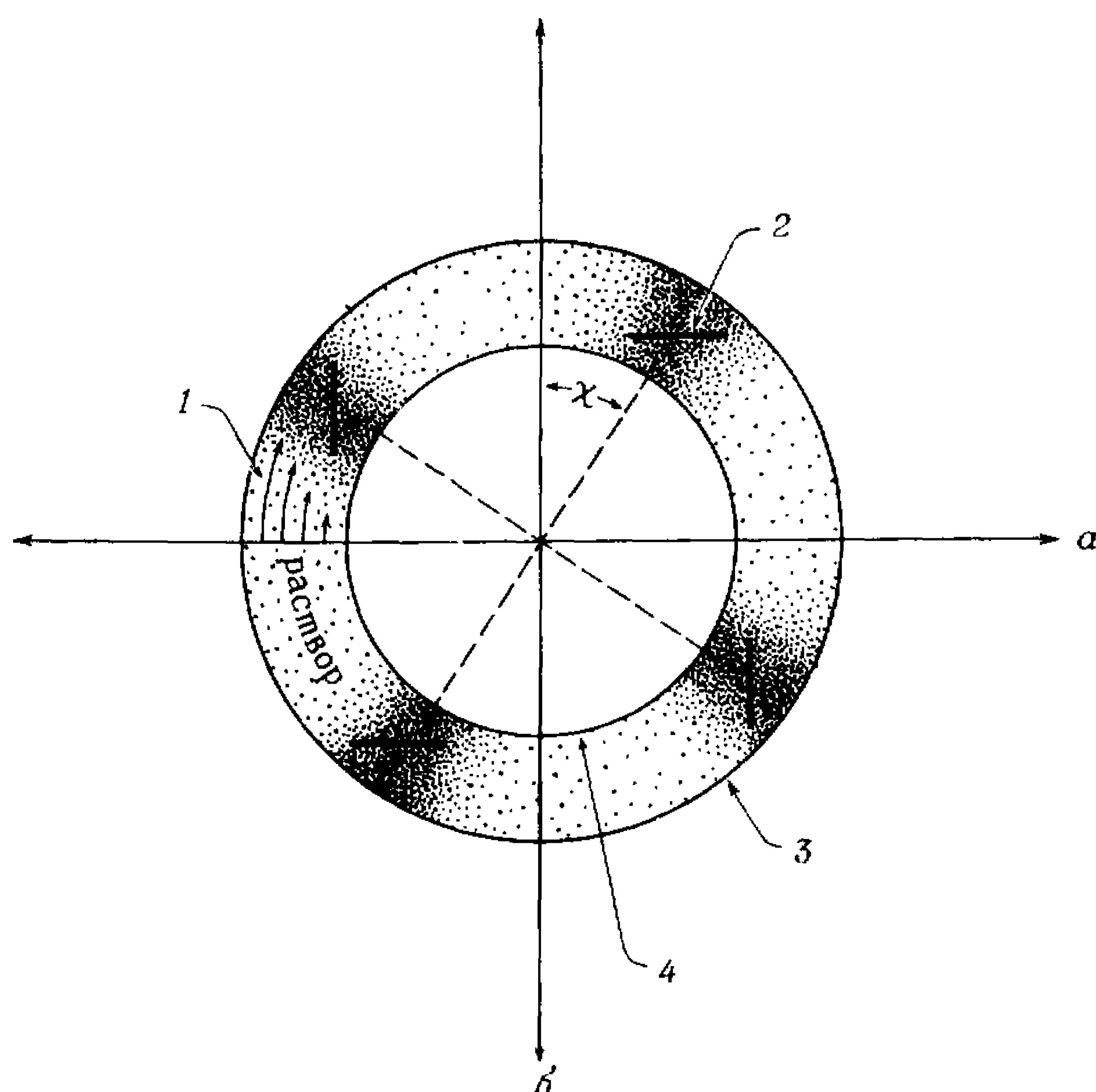


РИС. 18-11.

Вид вдоль оси прибора для измерения двойного лучепреломления в потоке. Раствор помещен между внутренним и внешним цилиндрами. Когда внешний цилиндр вращается, палочкообразные молекулы ориентируются в потоке. В двух местах они параллельны анализатору; в двух других местах они параллельны поляризатору. В этих четырех положениях свет не пропускается; «узор» из четырех темных районов известен под названием *креста*. Угол поворота креста χ относительно оси анализатора называют углом экстинкции.

1 — линии потока; 2 — палочкообразная молекула; 3 — вращающийся цилиндр; 4 — неподвижный цилиндр. *а* — ось поляризатора; *б* — ось анализатора.

где G — градиент скорости, а θ — коэффициент вращательной диффузии. Отсюда, откладывая зависимость χ от G, получаем прямую линию с наклоном — $15/(\pi\Theta)$. Уравнение (1) соблюдается только для малых G и небольших осевых отношений.

Этот метод использовался главным образом для определения осевого отношения и в некоторых случаях для наблюдения переходов спираль — клубок. В последнем случае, когда расположение молекул становится беспорядочным, они менее легко поддаются ориентации и двойное лучепреломление понижается.

Прибор для измерения двойного лучепреломления в потоке может быть также использован для измерения собственного двулучепреломления или дихроизма (гл. 14) молекул, которые могут быть почти целиком ориентированы при низких градиентах скорости (например, ДНК). Большинство молекул не могут быть

полностью распрямлены, так как необходимый для этого градиент скорости должен быть настолько большим, что возникнет турбулентность, которая нарушит ориентацию. Однако этого не случается с очень удлиненными молекулами.

Следующие два примера служат иллюстрацией того, как можно измерить ориентацию отдельных групп или молекул внутри макромолекулы.

Пример 18-Д. *Ориентация нуклеотидных пар в ДНК.* Основания ДНК «дихроичны», т. е. они поглощают УФ-свет вдоль преимущественного направления по отношению к их осям (гл. 14). Следовательно, если ДНК помещена в прибор для измерения двойного лучепреломления в потоке, все ее молекулы ориентированы и на них падает поляризованный свет, то молекулы будут поглощать свет только в том случае, если они образуют некоторые углы по отношению к плоскости поляризации. Следовательно, можно определить ориентацию оснований по отношению к оси ДНК.

Пример 18-Е. *Ориентация молекул профлавина, связанных с ДНК.* Профлавин также имеет преимущественное направление для поглощения голубого света. Выбирая длину волны, при которой поглощает профлавин и не поглощает ДНК, можно определить ориентацию связанного профлавина таким же путем, как и в примере 18-Д. Измерения такого рода показали, что молекулы профлавина параллельны парам оснований.

Список литературы

Albertsson P. A., Partition of Cell Particles and Macromolecules, Wiley-Interscience. Очень хорошая монография.

Cerf R., Scheraga H. A., "Flow Birefringence in Solutions of Macromolecules", Chem. Rev., **51**, 185—261 (1952). Хороший обзор по двулучепреломлению.

Englander S. W., Measurement of Nucleic Acid Hydrogen Exchange, in "Methods in Enzymology", vol. 12B, edited by L. Grossman and K. Moldave, Academic Press, 1967, pp. 379—386.

Printz M., von Hippel P. H., "Hydrogen Exchange Studies of DNA Structure", Proc. Nat. Acad. Sci., **53**, 363—370 (1965). Опыты по изучению «дыхания» ДНК.

Задачи

18-1. Вещество распределяется таким образом, что 98% оказывается в 20%-ном декстране и 2% в 20%-ном полиэтиленгликоле. Что произошло бы с веществом, если бы к раствору этого вещества был добавлен твердый полиэтиленгликоль до конечной концентрации 30%?

18-2. Для каких из следующих частиц наблюдалось бы двойное лучепреломление в потоке: сфера, удлиненный эллипсоид, жесткая палочка, гибкая палочка, цепь из шариков, молекулы кольцевой ДНК?

18-3. Как вы думаете, почему колбу в роторном испарителе нужно вращать?

18-4. Активно растущие бациллы имеют палочкообразную форму, типичное отношение длины к ширине составляет около 4. Стационарная культура состоит из бактерий с отношением длины к ширине приблизительно 2. Если бы вы собирались приготовить бесклеточный экстракт путем озвучивания, выбрали бы вы растущую или стационарную культуру? Поясните.

18-5. Какие факторы необходимо рассмотреть, выбирая метод концентрирования?

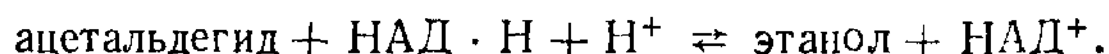
18-6. Предположим, что выполняя измерение двойного лучепреломления в растворе, вы измеряете положение креста при различных скоростях. По мере возрастания скорости вдруг наблюдается, что крест бледнеет и угол χ увеличивается. Что могло произойти?

Словарь терминов

Аденин — основание, входящее в состав ДНК и РНК. Для свободного основания употребляется сокращение А, для аденозина — rA и для дезоксиаденозина — dA.

Активный центр — область белка, в которой происходят превращения молекул субстратов.

Алкогольдегидрогеназа — фермент, который катализирует окислительно-восстановительную реакцию



$$\text{ацетальдегид} + \text{НАД} \cdot \text{Н} + \text{Н}^+ \rightleftarrows \text{этанол} + \text{НАД}^+.$$

Аминокислотная последовательность — порядок чередования аминокислот в полипептиде.

Анизотропный — обладающий физическим свойством, которое каким-то образом зависит от направления.

Антиген — вещество, способное вызывать образование антитела.

Антигенная детерминанта — определенный участок или химическая группа антигена, против которой направлено действие антитела.

Антитело — белок, синтезируемый животным в ответ на введение чужеродного вещества.

Апофермент (апобелок) — белок, для проявления активности которого требуется простетическая группа.

α-Углерод аминокислоты — атом углерода, к которому присоединена карбоксильная и аминогруппа.

α-Фосфат нуклеотида — фосфат, присоединенный к углеводу нуклеозида.

Бактериофаг — вирус, который размножается только в бактерии.

5-Бромурацил — основание, которое может замещать тимин в ДНК; при этом возрастает плотность ДНК. Для свободного основания употребляется сокращение BU, для дезоксирибозида — BUDR.

Гем — простетическая группа гемоглобина.

Гибрид ДНК — РНК — двойная спираль, в которой две цепи — одна из них ДНК, а другая — РНК — соединены водородными связями (путем комплементарного спаривания оснований).

Гидролиз — расщепление молекулы под действием воды.

Гидрофильный — проявляющий тенденцию связывать молекулы воды.

Гидрофобный — проявляющий тенденцию отталкивать полярные молекулы, такие, как молекулы воды, но связывать неполярные молекулы.

Гистон — белок с повышенным содержанием основных аминокислот, который встречается в хромосомах всех эукариотических клеток, за исключением спермы.

Гликопротеин — белок, в котором к пептидной части ковалентно присоединен углевод.

Голубой сдвиг спектра — любой сдвиг в область более коротких длин волн. Этот термин употребляется неправильно, в том смысле, что сдвиг к более коротким длинам волн максимума, лежащего в УФ-области, также называется голубым сдвигом, хотя фактически он происходит далеко от голубой области.

Градиент концентрации — система, в которой концентрация вещества изменяется в зависимости от времени или местоположения.

Градиент плотности — изменение плотности в зависимости от местоположения.

Граница раздела — в физической биохимии под этим обычно имеется в виду область, в которой меняется состав раствора.

Гуанин — основание, входящее в состав ДНК и РНК. Для свободного основания употребляется сокращение G, для гуанозина — rG и для дезоксигуанозина — dG.

Дальтон — единица молекулярной массы, масса атома водорода. В некоторых химических текстах называется авограммом.

Дансилхлорид — 1-диметиламинонафталин-5-сульфонилхлорид; химический реагент, который взаимодействует с аминогруппами белков, давая сильно флуоресцирующее соединение.

Двухсекторная ячейка — центрифужная ячейка, содержащая два отделения для образца.

Дихроичный — имеющий поглощение, которое зависит от относительной ориентации плоскости поляризации падающего света и оси молекулы.

Дифференциальная спектроскопия — метод, состоящий в том, что при получении спектра один спектр вычитается из другого.

ДНК-полимераза I — фермент из *E. coli,* способный копировать одноцепочечную ДНК или заполнять пропуски; он не является главным ферментом, ответственным за синтез ДНК.

ДНК-полимераза III — фермент из *E. coli,* ответственный за репликацию ДНК.

ДПН — дифосфопиридиннуклеотид, называется также никотинамидадениндинуклеотидом (НАД).

ДПН·Н — восстановленная форма ДПН; называется также НАД·Н.

ДСН — додецилсульфат натрия; детергент, который разрушает большинство белок-белковых и белок-липидных взаимодействий.

Изотропный — обладающий физическим свойством, которое не зависит от направления.

Индуктор — вещество, которое связывается с репрессором и уменьшает или полностью подавляет его активность.

Ионная связь — связь, образуемая за счет притяжения между положительно и отрицательно заряженными группами.

Ионная сила — мера общего количества свободных зарядов в единице объема; равняется $\frac{1}{2}\sum c_i Z_i^2$, где c_i и Z_i — соответственно концентрация и заряд i-го иона.

Катенан — структура, представляющая собой по крайней мере два протянутых друг через друга цикла, т. е. соединенных, как звенья елочной цепи.

Кодон — последовательность из трех соседних нуклеотидов, кодирующая отдельную аминокислоту.

Коллаген — белок, входящий в состав сухожилий, костей и кожи.

Конвекция — движение жидкости, вызванное локальными изменениями плотности.

Конканавалин А — белок растений, принадлежащий к классу, называемому лектинами; связывается с группами α-маннозы на поверхности клеток млекопитающих и вызывает агглютинацию.

Конкатемер — линейный полимер, состоящий из повторяющихся полимерных единиц; обычно имеют в виду ДНК, состоящую из более чем одной такой единицы.

Кофактор (кофермент) — небольшая молекула, необходимая для проявления ферментом активности; обычно отличается от простетической группы тем, что слабо связывается с ферментом.

Красный сдвиг спектра — любой сдвиг в область больших длин волн. Этот термин употребляется неправильно в том смысле, что сдвиг к бóльшим

длинам волн максимума, лежащего в инфракрасной области, также называется красным сдвигом, хотя фактически он происходит далеко от красной области.

Лиганд — небольшая молекула, которая связывается с большей молекулой (например, с макромолекулой биополимера).

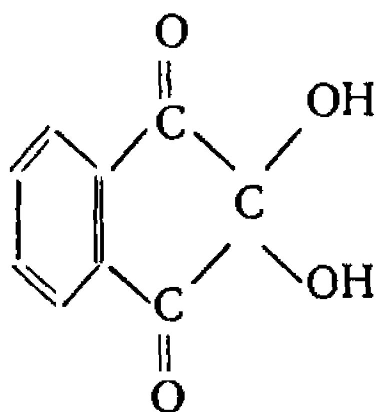
Лизис — разрыв клетки путем деструкции клеточной мембраны или клеточной стенки.

Лизоцим — фермент, который вызывает лизис некоторых бактерий путем разрыва полисахаридного компонента их клеточных стенок.

Липопротеин — белок, с которым ковалентно связан липид.

Набухание — процесс, при котором частица сухого геля впитывает жидкость.

Нингидрин — вещество, которое реагирует с аминокислотами.



При этом образуются сильно окрашенные соединения, которые можно легко обнаружить.

Нуклеаза — фермент, гидролизующий нуклеиновые кислоты путем расщепления фосфодиэфирных связей.

Олигонуклеотид — небольшое число нуклеотидов, соединенных фосфодиэфирными связямн.

Олигопептид — небольшое число аминокислот, соединенных пептидными связями.

Оператор — последовательность нуклеотидов в ДНК, с которой связывается репрессор.

Оптическая плотность — величина, характеризующая уменьшение интенсивности света при прохождении через образец. Определяется как $\lg \frac{I_0}{I}$, где I_0 и I — интенсивности падающего и прошедшего света соответственно.

Оптически активный — обладающий способностью вращать плоскость поляризации света и по-разному поглощать правый и левый поляризованный по кругу свет.

А·Т-пара — остатки адеиина и тимина, соединенные водородными связями.

G·С-пара — остатки гуанина и цитозина, соединенные водородными связями.

Пик — максимум на кривой. Положение пика обычно определяют по оси x. Величине пика соответствуют значения по оси y.

Плавление — денатурация биополимеров под действием тепла.

Плотность — масса единицы объема.

Поглощение — см. Оптическая плотность.

Подгонка кривых — процесс, при котором графически суммируется несколько известных кривых в таких пропорциях, чтобы получилась наблюдаемая кривая.

Полимераза — фермент, который соединяет нуклеотиды фосфодиэфирными связями.

Полинуклеотидкиназа — фермент, который переносит γ-фосфат от аденозинтрифосфата к 5′-OH-группе полинуклеотида.

Промотор — участок молекулы ДНК, с которым связывается РНК-полимераза и инициирует транскрипцию.

Простетическая группа — прочно связанная специфичная группа неполипептидной природы, необходимая для биологической активности белка.

Разрешающая сила — способность разделять два компонента.

Релаксация — возвращение системы, которая вначале была в равновесии, а потом выведена из него, к равновесному состоянию.

Репликационная вилка — участок хромосомы или молекулы ДНК, имеющий Y-образную форму и являющийся точкой роста при репликации ДНК.

Репрессор — белок — продукт регуляторного гена, способный связываться с оператором и предотвращать инициацию транскрипции.

Рибонуклеаза — фермент, который расщепляет РНК. Часто обозначается сокращенно как РНаза.

Рибосома — клеточная органелла нуклеопротеидной природы, в которой осуществляется белковый синтез.

РНК-полимераза — фермент, который полимеризует нуклеозидтрифосфаты в РНК, копируя последовательность оснований цепи ДНК.

Сведберг — единица измерения коэффициента седиментации.

Сополимер — полимер, содержащий более чем один тип мономера.

Субстрат — вещество, на которое действует фермент.

Температура плавления — температура, при которой переход, обусловленный плавлением, завершен наполовину.

Тимин — основание, входящее в состав ДНК. Для свободного основания употребляется сокращение T, для рибозилтимина — rT и для тимидина — dT.

мРНК — матричная, или информационная, РНК.

тРНК — транспортная РНК. Вид РНК, которые узнают кодон в мРНК и определенную аминокислоту и переносят последнюю к растущему концу белка.

Урацил — основание, входящее в состав только РНК. Для свободного основания используется сокращение U, для уридина — rU и для дезоксиуридина — dU.

Ферритин — содержащий железо белок, который используется как маркер в электронной микроскопии.

γ-Фосфат нуклеозидтрифосфата — фосфат, наиболее удаленный от углевода.

Химический сдвиг — в ядерном магнитном резонансе изменение условий резонанса ядра, вызванное химическим или физическим взаимодействием с другими ядрами или с электронами.

Хлорофилл — основной фоторецептор в растениях.

Хлоропласт — клеточная органелла, которая содержит хлорофилл.

Цвиттер-ион — молекула, которая в зависимости от pH может быть либо положительно, либо отрицательно заряжена *.

---

* Точнее, это молекула, имеющая в своем составе *одновременно* и положительно, и отрицательно заряженные группы.— *Прим. перев.*

Цитозин — основание, входящее в состав ДНК и РНК. Для свободного основания употребляется сокращение С, для цитидина — rC и для дезоксицитидина — dC.

Центрифугирование в градиенте плотности — центрифугирование раствора, который наслаивается на градиент плотности или который содержится в градиенте плотности.

Экзонуклеаза — фермент, разрывающий фосфодиэфирные связи так, что нуклеотиды один за другим отщепляются с конца полинуклеотидной цепи.

Элюирование — процесс выделения вещества из хроматографической системы.

Эндонуклеаза — фермент, расщепляющий внутренние фосфодиэфирные связи углеводофосфатного остова полинуклеотида.

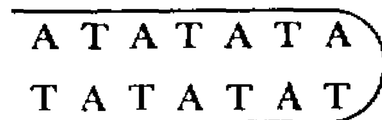
In vitro — эксперимент выполнен в бесклеточной системе.

in vivo — эксперимент выполнен в живых клетках.

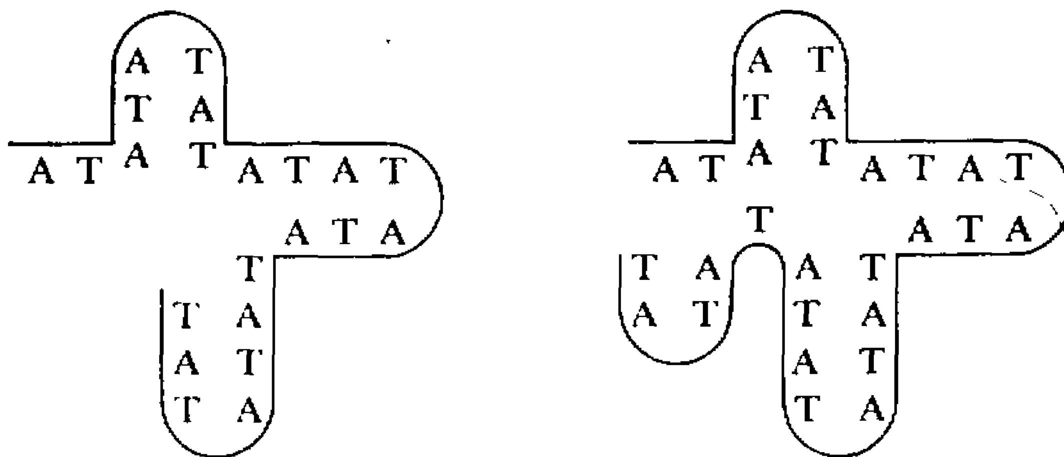
Ответы к задачам

ГЛАВА 1

1-1. Вследствие чередования А и Т любой участок цепи способен образовывать водородные связи с любым другим участком. Таким образом, возможны структуры типа шпильки



или различные сложные разветвленные структуры, например



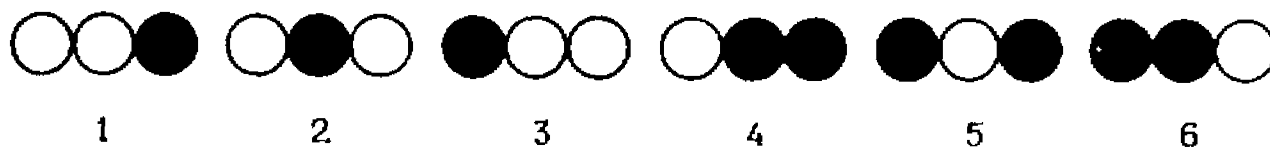
1-2. Пятнадцать.

1-3. Линейные и циклические димеры, тримеры и т. д., поскольку при высокой концентрации вероятность взаимодействия двух различных молекул почти равна вероятности взаимодействия двух концов одной молекулы.

1-4. Поливалин, так как заряженная аминогруппа лизина вызывает взаимное отталкивание мономеров. Для полилизина характерна сильная зависимость формы от pH, так как при некоторых значениях pH изменяется общий заряд.

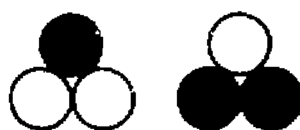
1-5. ДНК будет денатурировать, поскольку основания скорее будут реагировать с растворителем, чем друг с другом.

1-6. Можно представить себе шесть возможных линейных структур:



Однако, если субъединицы изотопны или симметричны, структура 1 будет идентичной структуре 3, а структура 4 — структуре 6; в результате останется только четыре типа.

Для треугольного расположения возможны две структуры:

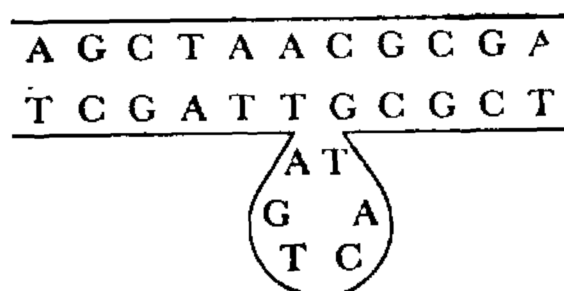


1-7. Одиннадцать.

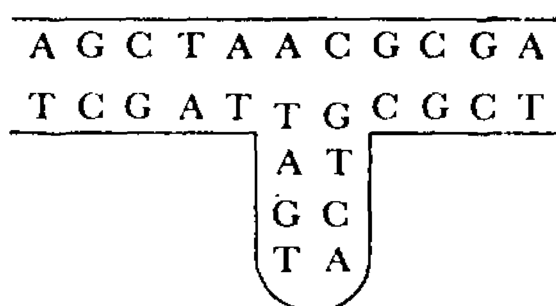
1-8. Существует несколько возможностей. Каждая субъединица может иметь положительно и отрицательно заряженные участки. Эти участки будут

взаимодействовать по простому механизму взаимодействия противоположных зарядов. Если же на поверхности имеются гидрофобные участки, то они могут взаимодействовать таким образом, что вода при этом исключается.

1-9. В первом случае:

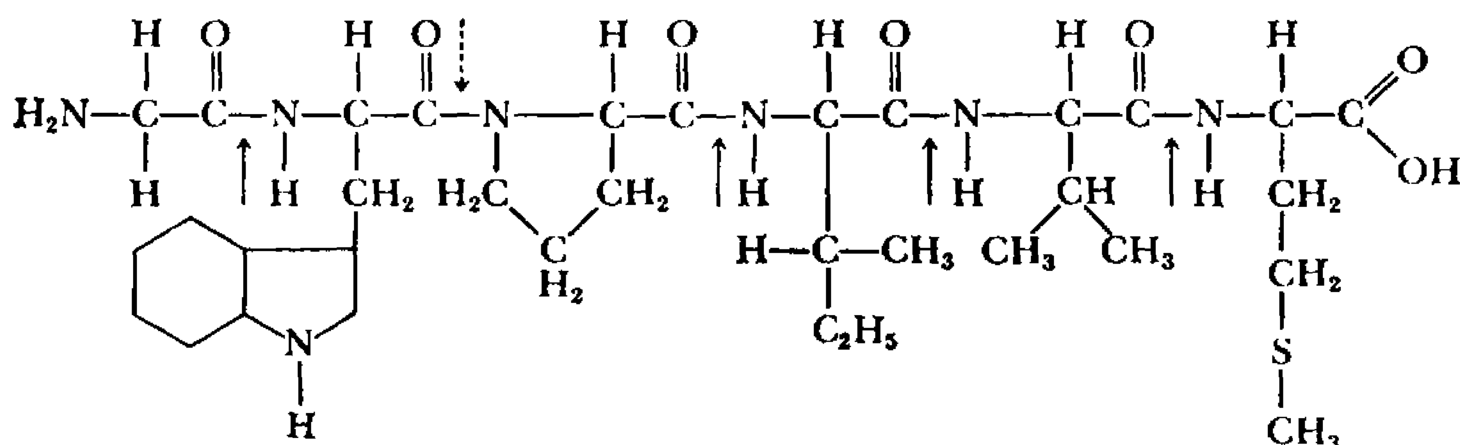


Во втором случае:



1-10. 1/16 легкой, 9/16 тяжелой и 3/8 гибридной.

1-11. Имеются только четыре пептидные связи (↓), так как связь C—N слева от пролина не является пептидной (⇣).



ГЛАВА 2

2-1. Если вирус присоединяет акридиновый оранжевый, он выглядит как светлая точка на темном фоне. То, что размер точки лежит ниже предела разрешения, роли не играет, поскольку разрешение соответствует способности разделения близко расположенных объектов. Следовательно, вирус не должен давать агрегатов, в противном случае полученное при подсчете число будет сильно заниженным. ДНК-вирусы наблюдать легче, чем РНК-вирусы, так как при связывании акридинового оранжевого с ДНК флуоресценция более интенсивна, чем при связывании с РНК.

2-2. При наблюдении сбоку они будут выглядеть одинаковыми.

2-3. Контраст получается за счет сдвига по фазе, который преобразуется в разность интенсивностей. Если объект содержит участки с различным поглощением, то контраст, получаемый за счет сдвига по фазе, может либо ослабевать, либо исчезать, либо усиливаться.

2-4. Следует удалить либо поляризатор, либо анализатор, а образец вращать. Яркость объекта с дихроичными свойствами будет при вращении изменяться.

2-5. Если на пути света в любом месте поставить голубой фильтр, то контраст будет усилен, поскольку голубой фильтр обычно поглощает красные или розовые лучи.

2-6. Скорее всего, он состоит либо из частично ориентированных волокон, либо из параллельных волокон, каждое из которых сжимается изнутри.

2-7. В случае флуоресцентного микроскопа контраст возрастает с увеличением интенсивности.

2-8. Во-первых, образец может высохнуть; во-вторых, он может потерять форму; в-третьих, если образец находится в жидкости, то поверхность жидкости может действовать как линза.

2-9. Клеточная стенка видна не будет. С помощью фазово-контрастного микроскопа клетка в целом может быть видна, если показатель преломления содержимого клетки отличается от показателя среды, в которой клетка суспендирована. Если клеточная стенка очень тонка, ее отсутствие может остаться незамеченным из-за фазового ореола.

2-10. Наблюдение 1 показывает, что УФ-облучение не разрушает хромосому. Из наблюдения 2 следует, что количество материала либо возрастает, либо уменьшается, причем второе более вероятно. Наблюдение 3 подтверждает 2. Наблюдения 4 и 5 показывают, что ДНК исчезает. Следовательно, УФ-облучение приводит к разрушению ДНК. В хромосоме должны присутствовать и другие компоненты, поддерживающие ее структуру даже при разрушении цепи ДНК.

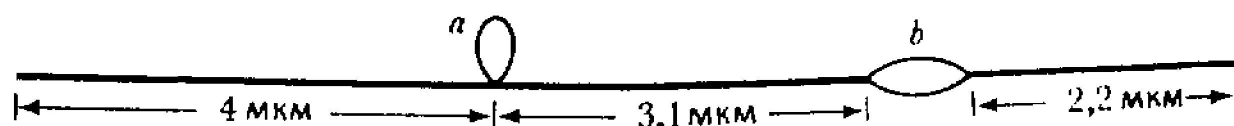
2-11. Объект должен состоять либо из линейных единиц, выходящих в радиальном направлении из одного центра или небольшого участка, либо из концентрических колец, каждое из которых содержит параллельные волокна. Если удалить анализатор, то крест исчезнет.

ГЛАВА 3

3-1. Частицы с темными центрами внутри пустые.

3-2. 750·(820/1250)=492 Å. Вирусы с короткими тенями, по-видимому, сжаты.

3-3. Если одно- и двухцепочечную ДНК обозначить тонкой и толстой линиями соответственно, структуру можно изобразить следующим образом:



Петля *a* имеет длину 0,5 мкм, а каждая цепочка петли *b* — длину 0,7 мкм.

3-4. Молекула имеет форму кольца, причем одна часть ее содержит двухцепочечный участок, длина которого составляет 1% от общей длины участка, ограниченного двумя одноцепочечными областями равной длины, составляющей около 1% от общей. Остальная часть молекулы является двухцепочечной. Короткий двухцепочечный участок представляет собой избыточный терминальный участок. Общая длина молекулы составляет 99% от первоначальной.

3-6. Металлические пленки не используют, так как они менее прозрачны для электронов, чем образец. Поэтому образец будет не виден.

3-7. Молекулы будут перекрываться, поэтому отдельную молекулу трудно проследить от начала до конца.

3-8. В слое толщиной 100 Å содержится приблизительно (100/400)·22= =5,5 вируса. Клетка содержит примерно 500 таких слоев в предположении, что при получении тонких срезов форма клетки остается неизмененной. Таким

образом, в клетке содержится приблизительно 2750 вирусов. Наиболее серьезным допущением при таком расчете является предположение, что вирусы равномерно распределены в объеме клетки (такое допущение редко бывает удовлетворительным). Другое допущение, сделанное для упрощения расчета, заключается в том, что все срезы имеют одинаковый диаметр; хотя для сферической частицы это невозможно, все же такое допущение вносит меньшую ошибку, чем допущение о равномерном распределении.

3-9. Если срезы делать перпендикулярно оси цилиндра, то будут наблюдаться круги, а если параллельно оси, то можно увидеть упакованные в стопку диски. Ширина дисков будет зависеть от положения среза, причем она будет максимальной, если срез делать по продольной оси. Если срез делается под углом, цилиндр будет выглядеть коротким, однако диски можно будет увидеть.

ГЛАВА 5

5-1. Один миллимоль содержит $6\cdot 10^{20}$ метильных групп. Если каждая из них содержит один атом ^3H, половина из них, или $3\cdot 10^{20}$, будут распадаться за 12 лет. Таким образом, радиоактивность равна $2{,}5\cdot 10^{19}$ расп/год, или $8\cdot 10^{11}$ расп/с, или 22 Ки. Следовательно, 6/22=27% молекул тимидина включают радиоактивную метку.

Молекула ДНК с молекулярной массой $25\cdot 10^6$ содержит 75 700 оснований или 18 940 остатков тимидина, из которых 18 940·0,27=5100 являются радиоактивными.

Если с помощью счетчика с эффективностью 52% для образца получено значение радиоактивности 1000 имп/мин, его действительная радиоактивность соответствует 1000/0,52=1923 имп/мин=$8{,}7\cdot 10^{-10}$ Ки. Отсюда содержание тимидина $(1/6)\cdot 8{,}7\cdot 10^{-10}=1{,}45\cdot 10^{-10}$ ммолей тимидина, или $1{,}45\cdot 10^{-13}$ молей. Если 50% пар оснований ДНК составляет А·Т, то на каждый моль тимидина приходится 3 моля других нуклеотидов. Средняя масса одного моля нуклеотида равна 330 г. Следовательно, масса ДНК, соответствующая 1000 имп/мин, равна $330\cdot 5{,}8\cdot 10^{-13}=1{,}9\cdot 10^{-10}$ г.

5-2. ^3H и ^{32}P являются наилучшей парой, поскольку уровни сцинтилляционного счетчика можно установить таким образом, что в канале ^3H будет находиться только малая часть радиоактивности ^{32}P.

5-3. Лучше всего для этого подойдет ^3H-тимидин, поскольку он включается только в ДНК, тогда как ^{32}P включается также в РНК, фосфопротеины и фосфолипиды.

5-4. В канале ^{14}C радиоактивность ^3H отсутствует, а в канал ^3H попадает 20% радиоактивности ^{14}C. Следовательно, 1620 имп/мин в канале Б соответствует только ^{14}C. Однако 0,2·1620=324 имп/мин ^{14}C в канале А. Следовательно, общая радиоактивность ^{14}C составляет 1620+324=1944 имп/мин, а радиоактивность ^3H равна 1450—324=1126 имп/мин. Соотношение $^3H/^{14}C$ составляет 1126/1944=0,58.

5-5. С поправкой на эффективность счета радиоактивность ^3H равна 4504 расп/мин, а радиоактивность ^{14}C составляет 2371 расп/мин. Соотношение $^3H/^{14}C$ равно 4504/2371=1,90. Отсюда молярное отношение тимидина к уридину 1,90/(6/0,5)=0,16.

Радиоактивность тимидина равна $4504/(2{,}2\cdot 10^{12})=2{,}1\cdot 10^{-9}$ Ки, что эквивалентно $(1{,}6)\cdot 2{,}1\cdot 10^{-9}=3{,}5\cdot 10^{-13}$ молей. В ДНК, содержащей 43% G·C, 0,285 всех нуклеотидов составляет тимидин. Следовательно, имеется $(1/0{,}285)\cdot 3{,}5\cdot 10^{-13}$ молей, или $4\cdot 10^{-10}$ г ДНК.

Радиоактивность уридина равна $2371/(2{,}2\cdot 10^{12})=1{,}08\cdot 10^{-9}$ Ки, или $2{,}16\cdot 10^{-12}$ молей. Количество молей нуклеотидов РНК составляет $(1/0{,}28)\times$ $\times 2{,}16\cdot 10^{-12}=7{,}7\cdot 10^{-12}$ или $2{,}54\cdot 10^{-9}$ г РНК.

5-6. ДНК с молекулярной массой $20 \cdot 10^6$ содержит $6 \cdot 10^4$ атомов; отсюда соотношение $^{32}P/^{31}P$ составляет $1/(6 \cdot 10^4)$, а концентрация ^{32}P в среде должна быть $10^{-3}/(6 \cdot 10^4) = 1{,}6 \cdot 10^{-8}$ моль/л, или $1{,}6 \cdot 10^{-11}$ моль/мл.

5-7. Возможная ошибка приблизительно 1% означает, что $N^{1/2}$ должно быть равным 0,01, где N — общее количество отсчетов. Отсюда образец необходимо считать по меньшей мере $(1/752) \cdot 10^4 = 13{,}3$ мин.

5-8. Скорость счета не будет зависеть от объема, так как образец считается двумя фотоумножителями. Фон, обусловленный радиоактивностью окружающей среды, будет уменьшаться с уменьшением объема.

5-9. Отношение каналов (Б/А) для каждого стандарта для тушения необходимо подсчитать, после чего получить зависимость его от эффективности определения; например, (А+Б)/1000. Из этой зависимости следует следующее уравнение: эффективность определения = отношение каналов. Поскольку для образца наблюдается соотношение каналов 1211/1822=0,66, действительное значение радиоактивности равно (1211+1822)/0,66=4595 имп/мин.

5-10. Образец объемом 0,1 мл содержит $0{,}04 \cdot 25 = 1$ мкг лейцина. Радиоактивность его равна $1251/0{,}70 = 1787$ имп/мин $= 8{,}1 \cdot 10^{-4}$ мкКи. Удельная радиоактивность составляет $8{,}1 \cdot 10^{-4}$ мкКи/мкг. В первоначальной культуре концентрация радиоактивности составляет $(0{,}1 \cdot 50 \cdot 25)/10 = 12{,}5$ мкКи/мл концентрация прибавленного лейцина равна $(0{,}1 \cdot 25)/10 = 0{,}25$ мкг/мл. Поскольку удельная радиоактивность белка значительно меньше удельной радиоактивности добавленного ^{14}C-лейцина, в среде должен находиться ^{12}C-лейцин с концентрацией $1{,}54 \cdot 10^4$ мкг/мл. Это значение настолько велико, что увеличением концентрации за счет прибавляемого лейцина можно пренебречь. Поэтому для того, чтобы увеличить скорость счета с 1251 до 5000 имп/мин, т.е. в 4 раза, достаточно просто прибавить в 4 раза больше ^{14}C-лейцина, или 0,4 мл.

5-11. Отношение скорости счета к шуму равно 3,7 для счетчика Гейгера — Мюллера и 1,9 для сцинтилляционного счетчика. Поскольку ожидается малая скорость счета, достоверность будет большей в том случае, когда фон вносит меньший вклад. Поэтому предпочтение следует отдать счетчику Гейгера — Мюллера. Естественно, что для получения той же ошибки образец при этом должен считаться большее время, чем с использованием сцинтилляционного счетчика.

ГЛАВА 6

6-1. Фаги выращивают в среде, содержащей ^3H-тимидин. Затем их облучают различными дозами рентгеновских лучей (включая нулевую). Далее фаги адсорбируются бактериями и вводят в них ДНК. Фаги удаляют из бактерий с помощью энергичного перемешивания. Бактерии отделяют от фагов, помещают на стеклянную пластинку, высушивают и покрывают либо покрывающей пленкой, либо тонким слоем эмульсии методом погружения. После экспонирования и проявления считают число зерен (n) над клетками и число клеток с зернами (N). Значение n, полученное для нулевой дозы облучения, соответствует числу зерен всей молекулы ДНК. Если облученный фаг вводит всю свою ДНК, то n и N не будут зависеть от дозы. Если же вводится только фрагмент, то n будет уменьшаться, а N будет оставаться примерно одинаковым.

6-2. При эффективности 94% можно будет обнаружить только $0{,}94 \cdot 42 = 39$ лучей. Вследствие логарифмической зависимости распада уравнение, описывающее время t, необходимое для получения N лучей при $N_0 = 39$ обнаруживаемых атомов ^{32}P, выглядит так:

$$39 - N = 39e^{-0{,}693t/\tau_{1/2}} = 39e^{-0{,}693t/14{,}2} = 39e^{-0{,}049t}.$$

Следовательно, для $N=12$ $t=7{,}5$ дня.

6-3. Если используется соединение, меченное ^3H, и авторадиограмма получается либо методом покрывающей пленки, либо методом погружения, плотность зерен будет максимальной вблизи от наблюдаемой границы клетки, однако она будет размыта по внутренней площади клетки, так как при наблюдении клеточная стенка находится и над, и под клеткой. Если же вещество находится только в цитоплазме, то плотность зерен будет либо равномерной по площади клетки, либо максимальной в тех участках, где клетка более толстая. Если авторадиограмма получается для тонкого среза клетки, то все зерна будут находиться на границе в том случае, когда вещество локализовано в клеточной стенке.

6-4. Клетки выращивают в стационарной фазе (т. е. деления клеток не происходит) в течение долгого времени в присутствии ^3H-тимидина. Затем клетки переносят на поверхность агара таким образом, чтобы они были отделены друг от друга. После этого клетки оставляют расти без ^3H-тимидина до тех пор, пока они не образуют микроколонию из нескольких сот клеток, после чего поверхность покрывают пленкой. Из-за полуконсервативного характера репликации ДНК одной хромосоме будет соответствовать образование двух меченых клеток в микроколонии. Если клетка содержит 4 хромосомы, то в микроколонии будет содержаться 8 меченых клеток.

6-5. Короткий пробег, свойственный ^3H, будет понижать эффективность, поэтому предпочтение следует отдать ^{14}C. Пробег β-частиц ^{14}C не так велик, чтобы уменьшить разрешение, поскольку длина трека ^{14}C очень мала по сравнению с размерами пятен на хроматограмме.

6-6. Используются ^3H-меченые аминокислоты с применением техники покрывающей пленки или погружения. Вначале клетки выращивают при 37°С в нерадиоактивной среде. Затем добавляют меченую аминокислоту и культуру разделяют на две части, одну из которых выращивают при 37°С, а другую — при 42°С. Через некоторое время клетки авторадиографируют. Если скорость при 42°С отражает тот факт, что включение происходит только в 10% клеток, а в 90% не происходит, то зерна должны иметься только над 10% клеток. Если скорость на клетку понижается в 10 раз, все клетки будут включать метку, однако среднее число зерен на клетку при 42°С составит 10% от того, что получается при 37°С. Для подсчета зерен необходимо использовать различные экспозиции, чтобы получить достаточно малое число зерен, позволяющее провести точный их подсчет.

6-7. Если клетки предварительно пометить путем выращивания в среде, содержащей ^3H-тимидин, а затем авторадиографировать, зерна образуются над всеми клетками. Если маленькие клетки не содержат ДНК, то над ними не будет зерен. Уменьшенное число зерен указывает на пониженное содержание ДНК.

РНК можно исследовать путем выращивания в среде с ^3H-уридином и большим количеством нерадиоактивного тимидина. Уридин является предшественником как РНК, так и ДНК. Тимидин предупреждает появление ^3H в ДНК, конкурируя с тимидином, который синтезируется по схеме уридин — дезоксиуридилат — тимидилат.

6-8. Сделать это не удается, так как при выращивании в присутствии ^3H-тимидина получается слишком много зерен за счет хромосомной ДНК, в которую погружены нуклеоли.

6-9. Мужские и женские клетки обычно не удается различить с помощью оптического микроскопа. Однако, если один тип растет в среде, содержащей ^3H-тимидин, а другой — в присутствии нерадиоактивного тимидина, их можно различить с использованием авторадиографии. Если смешать ^3H-мужские клетки с ^1H-женскими, то будут наблюдаться пары, состоящие из одной меченой и одной немеченой клетки. Если культуру ^3H-мужских клеток смешать с другой культурой нерадиоактивных мужских клеток и если при этом произойдет однополовое спаривание, то пары будут содержать одну меченую и одну нерадиоактивную клетки.

ГЛАВА 7

7-1. Нитроцеллюлоза растворима в ацетоне, поэтому лучше использовать стекловолокно.

7-2. Фильтрование следует предпочесть в том случае, когда частицы седиментируют очень медленно и когда осадок трудно вновь суспендировать. Метод не рекомендуется использовать, если количество осадка настолько велико, что фильтр засоряется, или если осадок связывается с материалом фильтра.

7-3. Изучением зависимости удерживания от размера пор. Если происходит адсорбция, то удерживание обычно не зависит от размера пор.

7-4. При высокой скорости потока линейные молекулы ориентируются и проходят сквозь поры по своей длине, тогда как кольцевые молекулы не могут стать достаточно тонкими и задерживаются. При низкой скорости потока задерживаются молекулы обоих типов.

7-5. Следует стерилизовать фильтр, держатель фильтра и сосуд, в который собирается фильтрат.

7-6. Образец отделяют на фильтре из стекловолокна и инкубируют в щелочи. Затем фильтр удаляют и жидкость подкисляют. Образующийся осадок собирают на отдельном фильтре. Значение фона составляет $0{,}0001 \cdot 0{,}01\% = 0{,}000001\%$. Нитроцеллюлозные фильтры растворяются в щелочи, поэтому их нельзя использовать.

7-7. Обратите внимание на то, что от 10^7 до $2 \cdot 10^7$ клеток остается на фильтре. Поэтому при фильтровании 10^7, 10^6 или 10^5 клеток все они останутся на фильтре.

7-8. Следует применить радиоактивный белок или нуклеиновую кислоту. Затем полимер следует подвергнуть диализу, раствор удалить, а пленку высушить. Измерение радиоактивности пленки покажет наличие или отсутствие в ней связанного полимера.

ГЛАВА 8

8-1. Гель-проникающую хроматографию.

8-2. С помощью гель-проникающей хроматографии.

8-3. Хроматографией на гидроксиапатите.

8-4. Линейная молекула будет элюироваться первой, поскольку кольцевая молекула занимает меньший сферический домен и с большей легкостью проникает в поры агарозы. Денатурированная РНК будет элюироваться первой по тем же соображениям.

8-5. Вероятно, при высокой концентрации происходит агрегация белка. Получающаяся крупная структура не может проникнуть в поры и выходит в свободном объеме.

Увеличение диаметра равносильно увеличению числа колонок, поэтому оно будет эффективным.

8-6. Двумерная хроматография с использованием системы изопропанол — HCl и уксусной кислоты.

8-7. Поскольку потери составляют только 5%, а фермент X составляет 30% от общего количества, нельзя допустить предположения, что фермент X не элюируется. Поэтому можно заключить, что X теряет свою активность. Объяснений этого может быть множество. В частности, потеря активности может происходить за счет диссоциации субъединиц или денатурирования за счет связывания с заряженными группами ДЭАЭ-целлюлозы.

8-8. В одноцепочечном диапазоне, поскольку одноцепочечная ДНК связывается более прочно, чем двухцепочечная. Если концентрация фосфата достаточна для того, чтобы вызвать диссоциацию двухцепочечного материала с

гидроксиапатита, то молекула останется связанной за счет своей одноцепочечной части.

8-9. В случае ионообменной хроматографии фермент и ионы Mg^{2+}, вероятно, элюируются при различных ионных силах. При использовании гель-проникающей хроматографии они могут разделяться за счет различий в размерах. В результате обеих процедур фермент теряет ионы магния, что может приводить к денатурированию. Этого можно избежать в случае гель-проникающей хроматографии, если гель предварительно уравновесить с Mg^{2+}, а элюирование проводить буфером, содержащим Mg^{2+}.

8-10. Морфин можно связать с матрицей и на полученном сорбенте проводить аффинную хроматографию.

8-11. Следует использовать гель-проникающую хроматографию при pH 8,5. Перед анализом белка каждую фракцию необходимо выдержать при pH 5,5.

ГЛАВА 9

9-1. При высокой ионной силе раствор будет обладать достаточной проводимостью, в результате чего ток будет настолько велик, что раствор перегреется.

9-2. Нет.

9-3. Изменение pH обычно оказывает наибольшее влияние, поскольку при этом изменяется общий заряд и знак заряда. Уменьшение ионной силы увеличивает доступность заряженных групп для растворителя, хотя изменение конформации белка может приводить к обратному эффекту. Температура также влияет на конформацию, однако эти изменения часто бывают обратимыми.

9-4. Нет, поскольку два белка могут обладать одинаковой подвижностью (например, в том случае, когда они обладают очень близкими значениями отношения заряда к массе).

9-5. Похоже, что белок состоит из двух субъединиц, причем одна из них обладает в 2 раза большей молекулярной массой, чем другая. Если обработанный ДСН белок фракционировать с помощью гель-проникающей хроматографии, относительные значения молекулярной массы можно получить из соотношения между объемом элюирования и молекулярной массой. После удаления ДСН из полученных фракций субъединиц их можно хроматографировать так же, как необработанный белок, с тем, чтобы определить относительную молекулярную массу каждой субъединицы в сравнении с интактным белком. Таким способом можно выяснить, состоит ли белок из двух субъединиц по одной каждого типа, из четырех субъединиц и т. д.

9-6. Относительные расстояния миграции получаются из соотношения $\lg 26\,000/\lg 1800 = 1{,}36$. Относительные площади отражают отношение масс или $(192 \cdot 26\,000)/(64 \cdot 1800) = 43{,}3$.

9-7. Наиболее полезным было бы изменение размера пор геля (посредством изменения концентрации или степени сшивания), поскольку в определенных пределах размера пор можно ожидать, что два белка, имеющих одинаковую подвижность, но различные молекулярные массы, будут разделяться за счет эффекта молекулярного сита. Для того чтобы убедиться в гомогенности белков, их можно анализировать методом гель-проникающей хроматографии, поскольку два белка с различными молекулярными массами могут иметь равные молекулярные объемы. Гомогенность можно также проверить методом седиментации (гл. 11).

ГЛАВА 10

10-1. Так как оптическая плотность увеличивается с разбавлением, исходная концентрация должна быть между 0,00 и 0,05 мкг. Следовательно, концентрация составляет приблизительно 0,03 мкг.

10-2. Положение зоны определяется как коэффициентом диффузии каждого реагента, так и относительной концентрацией каждого из них в точке эквивалентности. Поскольку точка эквивалентности при образовании преципитина не обязательно одна и та же для двух белков с одинаковыми коэффициентами диффузии, в результате получается две зоны. Одна зона будет получаться только в том случае, если два белка имеют преципитиновые кривые с одинаковой точкой эквивалентности. Аналогично два белка с одинаковыми коэффициентами диффузии могут не разрешиться, если точки эквивалентности различаются, но при этом достигается равновесие.

10-3. Вероятно, реакции будут сильно различаться, поскольку трехмерная структура аитигенной детерминанты нативного белка скорее всего претерпит значительные изменения при денатурировании.

10-4. Если замена аминокислоты произойдет не в области антигенной детерминанты и если это не повлияет на структуру детерминанты посредством общего изменения структуры белка, то влияния на антигенность не будет. Если же такое условие не соблюдается, то при значительном изменении антигенность будет потеряна, а при небольшом — станет незначительной.

10-5. Следует использовать радиоиммунологический анализ. Для этого можно связать препарат с альбумином бычьей сыворотки и иммунизировать кролика, чтобы получить антитело против препарата. Далее следует получить радиоактивную форму препарата, после чего построить калибровочный график путем прибавления различных количеств нерадиоактивного препарата к постоянному количеству радиоактивного в смеси с антителом. Затем к смеси радиоактивного препарата и антитела нужно прибавить различные аликвоты крови, определяя при этом количество препарата по калибровочному графику.

ГЛАВА 11

11-1. Гибкий стержень будет иметь большее значение s, так как он обладает меньшим коэффициентом трения. Полая и сплошная сферы будут иметь одинаковые s.

11-2. Если во время t молекула с $s=s_1$ находится на расстоянии r от мениска (который находится на расстоянии r_0 от центра вращения), а молекула с $s=s_2$ — на расстоянии R от r_0, можно записать следующие уравнения:

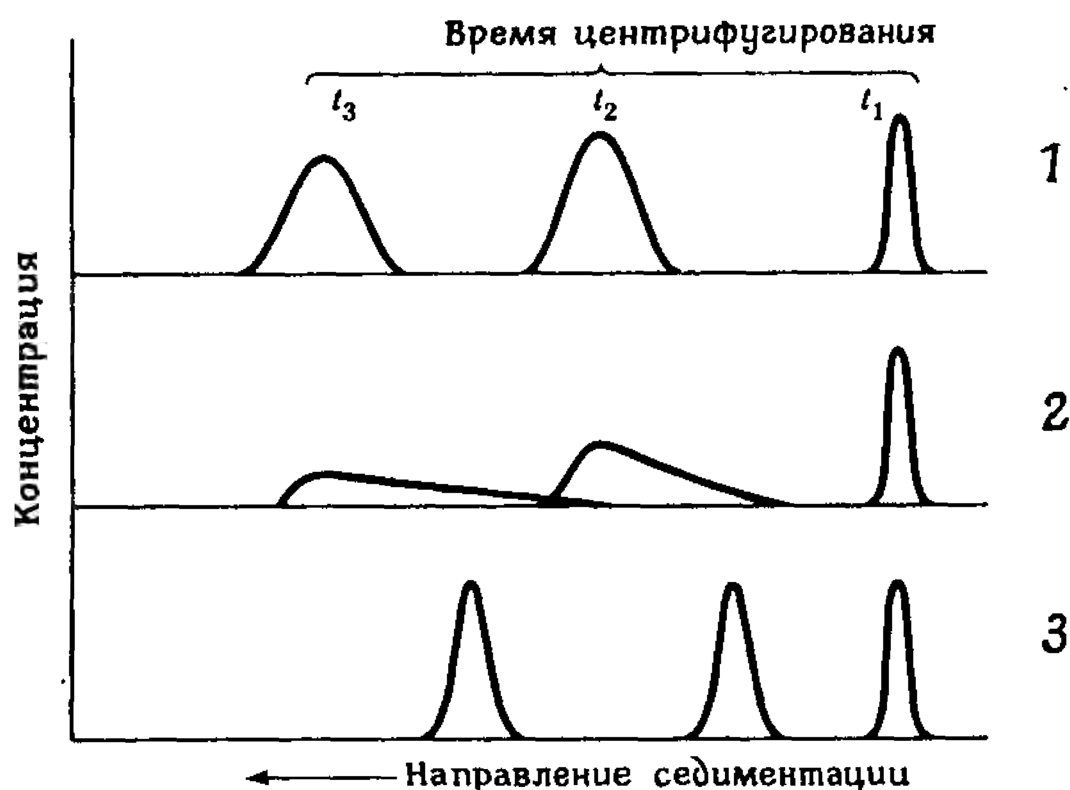
$$\ln r - \ln r_0 = s_1 t,$$

$$\ln R - \ln r_0 = s_2 t.$$

Если разделение $d=R-r$, то преобразование этих уравнений дает следующее выражение:

$$d = \left(e^{s_2 t} - e^{s_1 t} \right) r_0.$$

11-3.



Скорость диссоциации: *1* — низкая; *2* — средняя; *3* — высокая.

11-4. Если ДНК подвергли денатурации в формальдегиде, а затем седиментации в растворе с высокой ионной силой, то значение *s* для нее будет увеличиваться, как показано на рис. 11-17, но не уменьшится, если в ней присутствуют внутрицепочечные поперечные связи.

11-5. Если граница гомогенного вещества стала у́же, то обычно это показывает, что коэффициент диффузии уменьшился. В свою очередь уменьшение коэффициента диффузии обычно означает, что молекула увеличилась в объеме. Такое увеличение может также привести к уменьшению значения *s*. Следовательно, в первом случае реагент разрушил внутренние поперечные связи (например, дисульфидные мостики), так что молекула стала менее компактной. Если граница расширилась, то коэффициент диффузии увеличился и молекула стала более компактной. Это увеличивает *s*. Следовательно, уменьшение *s* и расширение границы не является просто следствием изменения формы. Молекулярная масса, возможно, уменьшилась, и реагент вызвал диссоциацию на субъединицы.

11-6. Нет. Полосы окажутся слишком широкими.

11-7.



11-8. Число субъединиц равно или кратно 3. В каждой тройке две субъединицы имеют молекулярную массу 5000, а одна — 15 000.

11-9. Разность плотностей ^{14}N- и ^{15}N-ДНК составляет 0,015 г/мл. Поэтому градиент плотности составляет 0,015 : 1,32 г·мл·мин$^{-1}$. Поскольку в *E.coli* 50% G·C, различие в плотности для каждой из них в ДНК *E.coli* составляет 0,098·0,20=0,0196 г/мл. Это соответствует расстоянию (0,0196 : 0,015)·1,32=1,72 мм от ДНК из *E. coli*.

11-10. Две трети молекул в препарате ДНК являются ковалентными

кольцами, одна треть — открытыми кольцами или линейными молекулами. Если имеет место в среднем один разрыв на молекулу, то $1/e=0{,}37$ ковалентных колец не подвергается разрыву. Поэтому $0{,}37\cdot(2/3)=0{,}246$ молекулы останется ковалентными кольцами, а 0,754 — нет. Соотношение площадей полос более плотного и более легкого вещества составит $0{,}246:0{,}754=0{,}326$.

11-11. Так как количество связанных молекул бромида этидия увеличивается, суперспирализованная ДНК разворачивается до тех пор, пока ее совсем не останется, а затем начинает скручиваться в противоположном направлении. В тот момент, когда отсутствует суперспирализация, молекула наименее компактна и ей соответствует минимальное значение s.

11-12. Липопротеин должен обладать меньшей плотностью, чем 1 М NaCl, и поэтому седиментирует в направлении, обратном центробежной силе.

11-13. В части Б реагент осадил ДНК так, что образовался осадок прежде, чем была достигнута скорость. В части В реагент прогидролизовал ДНК до мононуклеотидов или коротких олигонуклеотидов; ни те, ни другие не седиментируют при центробежных силах, с которыми обычно встречаются.

11-14. При 20 Ки/ммоль почти каждый тимидиновый остаток содержит один атом трития. Это увеличивает молекулярную массу на две единицы атомной массы. Для молекулы ДНК, в которой 50% пар оснований соответствует А·Т, это будет две единицы атомной массы на массу пары нуклеотидов со спаренными основаниями, молекулярная масса которой примерно равна 1320. Следовательно, если первоначально плотность составляла 1,698, то теперь она увеличится до $1{,}698\cdot(1322/1320)=1{,}701$, т. е. на 0,003 г/мл.

Для ^{14}C период полураспада составляет примерно 5000 лет, т. е. в 400 раз больше, чем для ^{3}H. Таким образом, в случае одного ^{14}C на остаток тимидина удельная радиоактивность составит $25:400=0{,}62$ Ки/ммоль. Следовательно, при 1 мКи/ммоль одному остатку тимидина будет соответствовать $1:0{,}62=1{,}6$ атома ^{14}C. По сравнению с ^{12}C это увеличит молекулярную массу на 3,2 единицы атомной массы. Вычисления, аналогичные тем, что проводились в случае с ^{3}H, приведут к результату, что плотность ДНК с 50% пар А·Т составит 1,702 г/мл. Для изотопа ^{32}P подобный расчет приведет к 1 атому ^{32}P на 8 нуклеотидов, что увеличит плотность на 0,0006 г/мл.

11-15. В этом случае может иметь место изменение формы; достаточное связывание иодид-иона может оказать влияние на молекулярную массу или может произойти димеризация, сопровождающаяся изменением формы. Изменение молекулярной массы можно заметить при равновесной седиментации.

11-16. ДНК можно детектировать при помощи абсорбционной оптики. Коэффициент экстинкции ДНК в максимуме поглощения (т. е. 260 нм) намного превышает соответствующую величину для белка при 280 нм. В случае белков с группами, имеющими большую абсорбцию (например, гемоглобин или цитохром *c*), это правило может не соблюдаться.

11-17. Более вероятно, что тот материал, который находился в осадке на дне пробирки, не был суспендирован при перемешивании. Величина s, полученная при втором центрифугировании, слишком велика, потому что концентрация ниже, чем первоначальная концентрация в клетке.

11-18. Комбинация акридинового оранжевого и видимого света изменяет ДНК таким образом, что связи в сахар-фосфатном скелете расщепляются при щелочных значениях pH.

11-19. Проведите седиментацию при разном времени и покажите, что расстояние изменяется пропорционально времени седиментации. Градиент плотности, который изокинетичен для ДНК, не будет изокинетичным для белка, так как ДНК и белок имеют разные плотности.

11-20. Нет, поскольку отсутствуют свободные концы для того, чтобы существовало торможение за счет вязкости.

11-21. Величина $s_{20,в}$ линейной ДНК уменьшится, потому что молекула удлинится и станет более жесткой. Этот эффект больше, чем тот, который имеет место вследствие большей массы комплекса.

11-22. Для нативных белков эффект, если его можно наблюдать, будет маленьким, потому что компактность белка обычно не является следствием присутствия дисульфидных связей.

В денатурированных белках его можно наблюдать, потому что дисульфидные связи не позволяют молекуле превратиться в неупорядоченный клубок.

11-23. Mg^{+} должен быть связан с ДНК в растворе CsCl, магниевая соль ДНК менее плотная, чем цезиевая.

ГЛАВА 12

12-1. Эффект в случае белков будет небольшим, поскольку причина эффекта в случае аминокислот заключается в том, что ионы Li^{+} и K^{+} могут связаться с карбоксильными группами и изменить плотность молекул. В белках присутствует только немного свободных карбоксильных групп.

12-2. Да, потому что относительная масса повышается из-за связывания Na^{+} и Mg^{2+} с фосфатами.

12-3. В пикнометре содержится 9,9249 г H_2O, следовательно, его объем составляет 9,9249:0,9982=9,9428 см³. Масса раствора в пикнометре равна 11,3251 г, а плотность 11,3251:9,9428=1,1390 г/см³. Раствор, состоящий из 3,5921 г растворенного вещества и 9,9413 г. H_2O, имеет общую массу 13,5334 г, а объем 13,5334:1,1390=11,8818 см³. Объем воды, который потребовался для приготовления раствора, составил 9,9413:0,9982=9,9592 см³. Следовательно, если масса увеличивается на 3,5921 г, объем изменяется на 11,8818—9,9592=1,9226. Следовательно $\bar{v}$=1.9226:3,5921=0,535.

12-4. Искривление обычно означает, что образец не гомогенен, а содержит много компонентов. Однако термическая конвекция может вызывать искривление. Если кривая состоит из двух ветвей, то образец состоит из двух типов молекул.

12-5.
$$M=\frac{\mathring{s}_{20,\,\text{в}}RT}{D^{\circ}(1-\bar{v}\rho)}=\frac{14{,}2\cdot10^{-13}}{5{,}82\cdot10^{-6}}\cdot\frac{(8{,}3100\cdot10^{7})\,293}{1-0{,}74\,(0{,}9982)}=2{,}275\cdot10^{5}.$$

12-6. Следует предпочесть более низкую скорость, потому что это приведет к тому, что диффузионное расширение произойдет за более короткое время. Проведение измерений со смесью двух компонентов целесообразно только тогда, когда две границы полностью разделены.

12-7. Уменьшение связано с возрастанием трения. Гибкий прут имеет большее D, так как он встречает меньшее сопротивление. D увеличивается по мере того, как уменьшается плотность, потому что более плотные молекулы более легко двигаются при столкновениях с молекулами растворителя.

ГЛАВА 13

13-1. При более высокой концентрации NaCl образуются внутрицепочечные водородные связи, и одноцепочечная ДНК становится более компактной; следовательно, [η] ниже. В формальдегиде аминогруппы оснований титруются и внутрицепочечные водородные связи не могут образоваться. В 0,01 M растворе NaCl такого эффекта не будет, потому что в отсутствие формальдегида нет водородных связей. В 1 M растворе NaCl одноцепочечная ДНК будет менее компактной в присутствии формальдегида, поэтому [η] будет больше 3. Однако [η] будет меньше 30, потому что в 1 M NaCl отрицательно заряженные

группы будут нейтрализованы и молекула может принять форму неупорядоченной спирали.

13-2. Бактерия стала проницаемой для белков, и внутриклеточные белки вышли из клеток.

13-3. а) Сфера большего радиуса, б) твердая сфера, в) жесткий стержень, г) сфера с плоскостями по обе стороны.

13-4. В воде, так как у глицерина вязкость выше, чем у воды.

13-5. а) Кольцевая, потому что под действием сдвига она будет деформироваться в структуру с половинной длиной и с двойной толщиной; б) денатурированная ДНК, потому что она будет очень компактной из-за внутримолекулярных водородных связей; в) ДНК в 1 М NaCl, потому что она будет более компактной; г) они будут почти одинаковы, но перекрученное кольцо будет несколько более устойчивым, потому что оно короче.

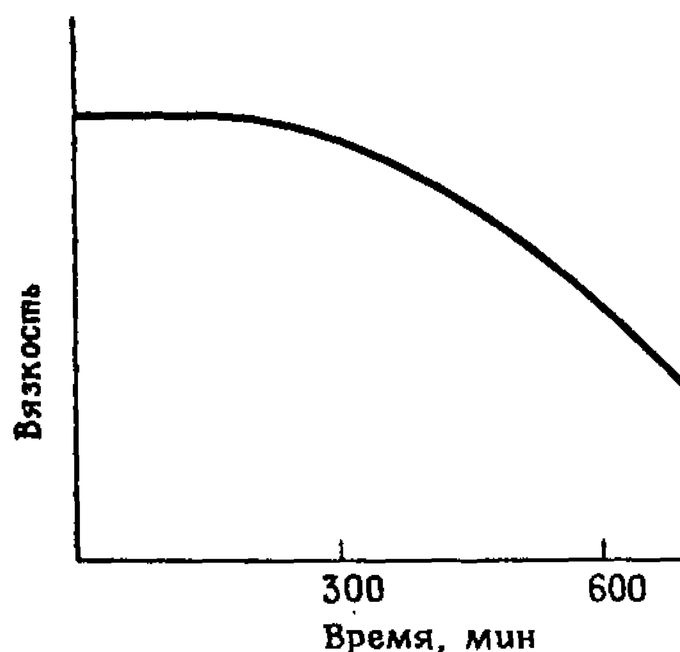
13-6. Если [η] возрастает, то молекула, вероятно, компактна. Если [η] уменьшается, то она, вероятно, растянута в нить. С уменьшением [η] неточность возрастает, потому что белок, вероятно, состоит из субъединиц, которые диссоциируют в 6 М хлориде гуанидиния.

13-7. Ионы могут разрушить квазикристаллическую решетку воды (т. е. уменьшить взаимодействие между молекулами воды).

13-8. Полинуклеотид стал более растянутым. Если ионная сила низка, то изменение pH может разрушить внутрицепочечное взаимодействие оснований; возникшее при этом отталкивание между фосфатными остатками вызовет растягивание одноцепочечной молекулы. При высокой ионной силе более вероятно, что полинуклеотид превратится из одноцепочечного в двухцепочечный.

13-9. Препарат ДНК, вероятно, содержит основные белки. При низкой ионной силе белки связаны с ДНК и вызывают межмолекулярную агрегацию, что уменьшает вязкость. Если ДНК разбавить перед уменьшением ионной силы, концентрация ДНК и белка может быть достаточно низкой, так что агрегация не произойдет.

13-10.



ГЛАВА 14

14-1. 32 мкг/мл=0,032 г/л=0,032/423=0,000076 моль/л. Следовательно, ε=0,27/0,000076=3552.

14-2. При смешении растворов А и Б оптические плотности смеси должны быть D_{260}=0,301 и D_{450}=0,460. По-видимому, не имеется взаимодействия меж-

ду А и Б. Было сделано допущение, что при разбавлении соблюдается закон Бера.

14-3. Различить нативную и денатурированную ДНК можно по гиперхромии при 260 нм, возникающей в результате кипячения или добавления щелочи. Другой путь состоит в измерении спектра, потому что максимумы поглощения нативной и денатурированной ДНК различаются.

14-4. Необходимо измерить оптическую плотность в максимуме поглощения цитохрома *c*. Однако бактерии сильно рассеивают свет, так что необходимо определить спектр при бо́льших длинах волн, чтобы можно было ввести поправку на рассеяние.

14-5. Закон Бера не соблюдался, пока раствор не был разбавлен 1:2. При разбавлении 1:4 наверняка будет линейная зависимость и молярность раствора составит 0,84/348=0,0024. Молярность начального раствора в пять раз больше, что составляет 0,012 моля.

14-6. Отношение D_{260}/D_{280} выделенного вещества А меньше, чем чистого А, так что должно присутствовать некоторое количество Б. Если на каждую часть А приходится x частей Б, можно написать следующее уравнение:

$$\frac{5248+311x}{3150+350x}=\frac{2{,}50}{2{,}00}.$$

Следовательно, $x=10{,}5$. Тогда доля наблюдаемой D_{260}, обусловленной А, равна 5248/[5248+(10,5)311]=0,616. Следовательно, D_{260}, обусловленная А, составляет только 0,616·2,50=1,54 и концентрация А равна 1,54/5248=0,00019 моль/л.

14-7. ДНК частично денатурирована при 20°С.

14-8. Все поглощающие группы расположены внутри или по крайней мере в полостях, недоступных для этиленгликоля.

Белок содержит восемь триптофановых остатков. Ни один из них не расположен на поверхности. Четыре остатка, возможно, находятся в полостях, которые у́же, чем 9 Å, и шире, чем 4 Å, так как эти остатки доступны диметилсульфоксиду и недоступны сахарозе. Еще четыре остатка либо расположены внутри, либо находятся в очень узких полостях. Альтернативное объяснение состоит в том, что все они могут быть внутренними, так как диметилсульфоксид вызывает частичное разворачивание молекулы.

14-9. Шесть тирозиновых остатков находятся на поверхности. Полное разворачивание происходит при рН 11,7. Когда рН раствора белка снова становится равным 6, белок снова сворачивается, но так, что только четыре тирозиновых остатка остаются на поверхности.

14-10. Имеется два класса ДНК: 20% ДНК имеют G·C-состав меньше, чем 50%, и 80% имеют G·C-состав больше, чем 50%. Так часто бывает, если бактерия содержит дополнительную молекулу ДНК, называемую плазмидой. Другое объяснение: культура, из которой выделена ДНК, могла быть загрязнена другими бактериями.

Десять процентов ДНК при нагревании до 75°С денатурировали.

ГЛАВА 15

15-1. При высокой концентрации белок димеризуется и либо участок контакта есть участок связывания АНС, либо димеризация вызывает конформационный переход, в результате которого увеличивается полярность поверхности.

15-2. Триптофан может находиться внутри, располагаться в полости, слишком узкой для проникновения иодид-ионов, или быть по соседству с отрицательно заряженными аминокислотами.

Все триптофановые остатки могут не иметь один и тот же квантовый выход, и часть триптофановых остатков, находящихся на поверхности, может находиться в отрицательно заряженных участках.

15-3. Нет, так как спектр поглощения димера обычно отличается от такового мономера.

15-4. Нет.

15-5. Комплекс может иметь другие энергетические уровни, или может быть понижена вероятность тушения. Ввиду различий в энергетических уровнях возможны спектральные сдвиги в любую область.

15-6. Нет, потому что некоторые переходы не приводят к флуоресценции.

15-7. Флуоресценция триптофановых остатков уже могла быть потушена. Лиганд мог удалить один тушащий фактор в белке, однако взамен ввести другой. Связывание лиганда могло привести к конформационной перестройке всей молекулы, так что тушение флуоресценции остатков в участке связывания компенсируется увеличением флуоресценции триптофановых остатков, которые находятся где-нибудь в другом месте молекулы и были частично потушены до связывания лиганда.

15-8. O_2 может быть возбужден в результате процесса переноса энергии. В ином случае основания ДНК могут быть возбуждены и могут стать более чувствительными к окислению невозбужденным O_2. Акридиновый оранжевый и O_2 могут образовать комплекс, который при возбуждении становится очень реакционноспособным.

15-9. По мере возрастания ионной силы белок разворачивается, так что участки, содержащие флуоресцирующий хромофор, становятся более гибкими. В ином случае белок может стать очень компактным или очень симметричным, что также способствует более быстрому вращению.

15-10. В случае первого наблюдения флуоресцирующий хромофор располагается достаточно близко от триптофана, и происходит миграция энергии. Хромофор находится на поверхности. Следовательно, триптофан располагается на поверхности. Возможно, что триптофан находится не в отрицательно заряженном участке и защищен от тушения хромофором.

Второе наблюдение можно объяснить так же, как и первое, за исключением того, что флуоресцирующий хромофор не защищает триптофан от тушения за счет столкновений.

В случае третьего наблюдения при pH 9 происходит конформационная перестройка, которая уводит *F* от триптофана.

В случае четвертого наблюдения при pH 9 триптофан и флуоресцирующий хромофор расположены очень близко один от другого.

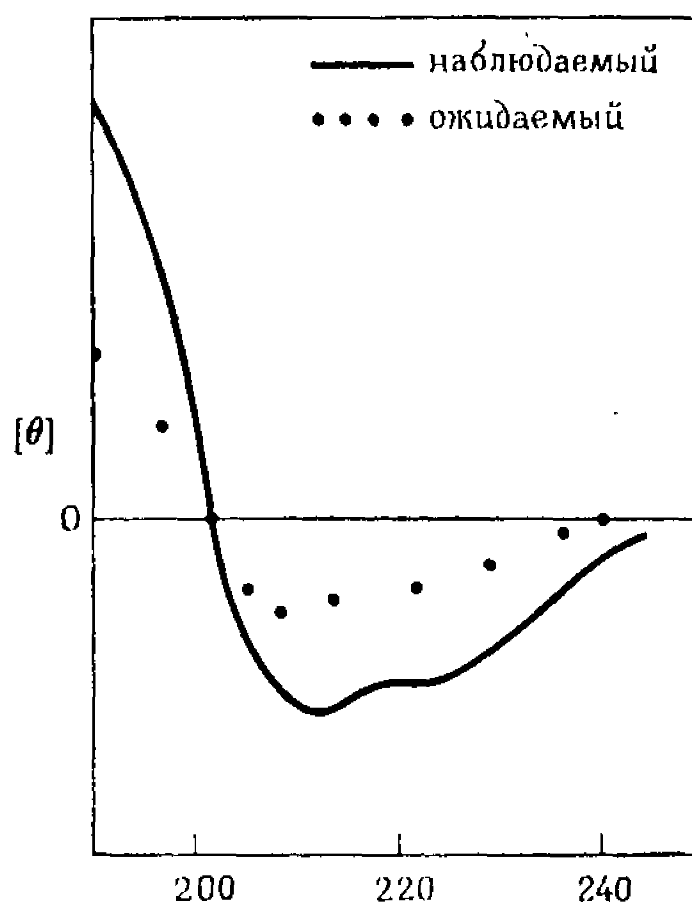
ГЛАВА 16

16-1. Волна, которая запаздывает на 90°, должна быть продвинута вперед на 90°. В случае эллиптически-поляризованного света должна отличаться максимальная длина векторов **E**.

16-2. Они, вероятно, являются зеркальными отображениями.

16-3. Возможно, что конформация в растворе и кристалле различна. Поскольку различие очень велико, вероятно, имеется либо чрезвычайно гидрофильный, либо чрезвычайно гидрофобный участок.

16-4.



16-5. Используя метод КД, их можно отличить от базисной линии.

16-6. Путем разбавления.

16-7. В районе пика поглощения.

16-8. ДНК раскручивается и этидийбромид располагается внутри спирали ДНК.

16-9. Уменьшение должно быть более значительным в 0,5 М NaCl, так как в 0,01 М NaCl молекула будет протяженной и все основания будут участвовать в образовании стэкинг-конформации.

16-10. ДНК компактно свернута в головке фага. Способ свертывания отличается от одного фага к другому.

16-11. Доля оснований, не участвующих в стэкинг-взаимодействиях (т. е. концевых), становится небольшой.

16-12. Некоторые полиаминокислоты образуют α-спирали, другие — нет. В одних нет взаимодействий боковых групп, в других они есть и в зависимости от степени полярности могут обусловливать притяжение или отталкивание. В полипролине нет пептидных связей.

ГЛАВА 17

17-1. (а) 1; (б) 1; (в) 1; (г) 1; (д) 1; (е) 2, один от OH-, один от протонов CH_3-группы; (ж) 3, один от OH-, один от квартета CH_2-группы и триплет от CH_3-группы.

17-2. При всех концентрациях спектры фенилаланина и глицина должны быть аддитивны, потому что маловероятно наличие настолько больших концентраций, чтобы кольцевые токи фенилаланина привели к сдвигу сигналов глицина. Однако в случае смеси фенилаланина и тирозина при высоких концентрациях должны быть изменения в спектре, потому что эти аминокислоты проявляют тенденцию к образованию стопкообразных структур (стэкинг-конформации). Следовательно, будет наблюдаться взаимное влияние кольцевых токов.

17-3. Вследствие низкого содержания ^{13}C очень редко два ядра ^{13}C будут соседствовать друг с другом. Следовательно, расщепления не должно происходить. При обогащении вероятность соседствования ядер возрастет и указанное преимущество будет потеряно.

17-4. В ходе реакции должны появиться линии, соответствующие промежуточным соединениям. Отношение площади этих линий к таковой исходных реагентов указывает на относительные концентрации промежуточных соединений и реагентов в зависимости от времени.

17-5. Нет, потому что связывание субстрата могло вызвать в белке конформационную перестройку, которая явилась причиной смещения сигналов. Наличие сдвига линий и особенно его довольно большая величина указывают на то, что сто́ит и дальше исследовать поведение гистидина. Если бы не было сдвига, было бы очень вероятно, что гистидина нет в месте связывания.

17-6. Нет, потому что для расщепления необходимо, чтобы взаимодействующие ядра были ковалентно связаны, а при денатурации не происходит изменений в ковалентных связях.

17-7. Во-первых, смешать фермент и кофактор в отсутствие субстрата и посмотреть на смещение пиков. Во-вторых, смешать субстрат и кофактор и посмотреть на смещение. Затем добавить фермент и посмотреть на дальнейшее смещение или сдвиги пиков фермента. В-третьих, смешать фермент и субстрат. Если смещения нет, добавить кофактор и посмотреть, не произойдет ли смещение.

17-8. Должна отличаться ширина линий, так как протоны во льду менее подвижны, чем протоны в воде. При замерзании следует также ожидать изменения положения линий.

17-9. Линии протонов, находящихся в участках связывания, должны сдвигаться. Большинство линий уширится из-за уменьшения подвижности димера по сравнению с мономером.

17-10. Похоже, что в белке имеется по крайней мере один парамагнитный центр — возможно, ион переходного металла. Добавление хелатного агента должно привести к уменьшению величины химических сдвигов и вызвать сужение сигналов. Однако, если металл ковалентно связан, этого не произойдет. Поэтому нужно предусмотреть химические тесты на присутствие металла.

17-11. Для раскрытых колец ДНК различий не будет. Если бы цикл был сверхскрученным, различия должны были быть, потому что при высокой степени скручивания многие пары оснований разорвались бы и в ДНК появились бы односпиральные участки.

ГЛАВА 18

18-1. Оно, вероятно, выпало бы в осадок.

18-2. Для всех, кроме сферы. В случае кольцевой ДНК необходимо было бы высокое напряжение сдвига.

18-3. Поскольку пленка жидкости увлекается вверх от основной части раствора, возрастает отношение поверхности к объему, что приводит к возрастанию скорости испарения.

18-4. Растущую культуру, потому что более длинные клетки будут более чувствительны к разрыву, обусловленному градиентом скорости.

18-5. Термическую стабильность, чувствительность к низкой и высокой ионной силе и материалы, на которых может необратимо адсорбироваться интересующее нас вещество.

18-6. Вероятно, под действием градиента скорости молекулы разорвались пополам.

Предметный указатель*

Аберрация 30
изображения точки 30 и сл.
— — сферическая 30, 64
искривление поля 38
кома 31
конденсатора 36
хроматическая 31, 64
Авторадиография
взаимное расположение источника излучения и эмульсии 136, 137 и сл.
выбор изотопа 138
ДНК 143, 144 и сл., 146 и сл., 148, 151
контакт между эмульсией и образцом 141—147
метод нанесения эмульсии 132, 133, 144 и сл., 146 и сл.
молекулярная 148—151
разрешение 138 и сл.
треки излучаемых частиц 133—135, 137, 139, 140
и электронная микроскопия 149
Агар
гель, реакции преципитации 251
пластинка 243
Агароза
в иммуноэлектрофорезе 243
как матрица в аффинной хроматографии 217
получение гелей 198
Агароза-гель в электрофорезе 228, 233 и сл .
Агглютинация 263
пассивная 257, 264
Айри диски 31
Акридиновый оранжевый 54, 55, 427, 428, 430, 431, 442, 443, 446
Активированный уголь как носитель 177
Активный центр 127 и сл., 403, 406, 424, 436, 505—507
Альбумин сывороточный быка 436, 507—509
Аминокислоты 12—13, 14
Амфолит 239
Анализатор 47, 48, 49
амплитуды импульсов 109
Анастигматы 31
Анизотропия испускания 445

* См. также «Словарь терминов», стр. 540—544.

1-Анилин-2-нафталинсульфонат-анион как флуоресцентная метка 427, 428, 429
Анионообменник 208
Антигаптен 249
Антиген 247
Антисыворотка 248
Антитело
определение 247
очистка 218, 248, 249
получение 248—250
поляризация флуоресценции 441 и сл.
связывание с ферритином 272
флуоресцирующее 55, 57, 446
Антитело — антиген
исследование связывания с помощью поляризации флуоресценции 439, 440
разделение 259—261
реакции 248, 249 и сл., 255, 256
Апохромат 35
Астигматизм 31
Ацетальдегид, ПМР-спектр 490 и сл.

Бактерии, проницаемость для адениловой кислоты 123 и сл.
Белки
ассоциация 404 и сл., 441
гибридные 23
денатурация 403, 425, 441 и сл., 471, 503 и сл.
диссоциация 22
изоэлектрическая точка 239
изучение методом пертурбации растворителем 400—403
— — поляризации флуоресценции 439
конформация 400 и сл., 426 и сл.
— изменения 470—472
молекулярная масса, определение 200 и сл.
обнаружение дисульфидных мостиков 374 и сл., 413
— родства между ними при помощи перекрестных реакций 268
образование пространственной структуры 471 и сл.
определение общей формы 373 и сл.
— содержания спиральных структур 467 и сл.
ориентация водородных связей 411

осаждение на сульфате аммония 218, 531
очистка 124 и сл., 203, 218
переход спираль — клубок 441 и сл.
разделение с помощью диск-электрофореза 237 и сл.
связывание 205
— небольших молекул 403 и сл., 411, 507 и сл.
спектрофотометрическое титрование 399 и сл.
спектры 498 и сл., 500—511
— эмпирические правила для интерпретации 422, 423
стандарты в ДОВ и КД 467 и сл.
структура 426 и сл., 467—470, 500—509
транспортные, очистка 218
флуоресцентные метки и зонды 427, 428
флуоресценция, измерение 421, 422, 423—427
Бертрана линза 58
Биогель 198, 199, 210
Биоглас 198
Блок-электрофорез 243
Бромциан — сефароза 218

Вискозиметр
Зимма — Крозерса 370—371, 379
Куэтта 369, 371, 379, 536 и сл.
Освальда 367—368
Уббелоде 367, 368
Вискозиметрия, примеры использования 373—378
Внутримолекулярное экранирование 487 и сл.
Водородные связи 14, 15, 522, 525
Водородный обмен 410, 413, 521—523
Возбужденное состояние 377 и сл.
Вращение
молярное 456
поляризованного света 454, 455
удельное 456
Вторичная структура 16
Высаливание 531
Вязкость 360—381
влияние макромолекул на 362—366
внутри живых клеток 444
измерение 367—371
коэффициент 361
относительная 362, 365, 366, 372, 373, 377
поляризация флуоресценции 438, 444
теория 360—362
удельная 362
характеристическая 362, 363, 372 и сл.
Вязкоэластичность 378—381
время запаздывания 380
— релаксации 380

Газовое усиление *см.* Ионная лавина
β-Галактозидаза, измерение оптической активности 394 и сл.
Гаптены 247 и сл., 249
Гасящие агенты 102 и сл., 108
Гибридизация 22 и сл., 525—531
анализ с помощью нитроцеллюлозных фильтров 161—163, 527
примеры 529—531
Гейгера — Мюллера счетчик 101—103, 112
Гексаметилбензол, поглощение света 407
Гель-электрофорез 228—234
Гемагглютинация 263
Гемоглобин
ориентация групп гема в кристаллах 52
свойства участка связывания гема 429
Гибрид ДНК — РНК 23, 162
Гиперхромия 396
Гипохромия 390, 392, 472
Гликопротеины, очистка 218
Градиент
концентрации 180, 181, 240, 283 и сл., 308 и сл.
pH 239—242
плотности колонки 352
— получение 180, 181
— седиментационое равновесие 329—332
— — — примеры использования 332—344
сахарозы, седиментация в предварительно подготовленном 307—313

Дайсона система 45
Дауэкс 209
Двойная метка 95, 109, 110 и сл.
Двулучепреломление 47 и сл.
в поляризационной микроскопии 47, 48, 49 и сл.
в потоке 536 и сл.
применение 50 и сл.
Деградация 365 и сл.

Дезоксирибонуклеиновая кислота 14, 15
автораднография 143, 144 и сл., 146 и сл., 148, 151
бактериальная, обнаружение радиационных повреждений 323
гетеродуплексный метод изучения 81 и сл., 530 и сл.
гибридизация 525—531
гибридная 23
гликозилированная, отделение от негликозилированной 340
денатурация 265 и сл., 299 и сл., 393, 396 и сл.
димеры 343 и сл.
ИК-спектр 409
количественное определение 448
комплекс с белком 160—165
— с гистонами 377 и сл., 505 и сл.
— с флуоресцентными хромофорами 442 и сл.
конформация 320
линейная 24
липкий конец 24
матрица для мРНК, идентификация 530
меченая 127, 332, 333
молекулярная масса 122 и сл., 314 и сл., 380 и сл.
оптическая плотность 396
ориентация в хромосоме, определение 52, 443 и сл.
— нуклеотидных пар 538
— оснований по величине двулучепреломления в потоке 536 и сл.
процесс впрыскивания фагами 378
прочность пар оснований в 304—306
равновесное центрифугирование 332—344
разделение гель-электрофорезом 233 и сл.
разрушение рентгеновскими лучами 302 и сл.
растворы, измерение вязкоэластичности 378—381
расщепление гидродинамическим сдвигом 517 и сл.
ренатурация 398, 525 и сл.
связывание белков 82 и сл., 164
седиментационный анализ 285 и сл., 319—325
синтез в живых клетках 131
соотношение кольцевой и линейной форм в молекуле 375 и сл.
спектр поглощения 391, 392
спираль — клубок переход 265 и сл., 403
степень разрыва одно- и двухцепочечной 517—519
УФ-облучение 271
фракционирование 320, 339 и сл., 375 и сл.
— методом распределения 535 и сл.
хроматография на гидроксиапатите 216 и сл.
циклическая 24 и сл.
эксперимент «звезда» 143 и сл.
электронная микрофотография 79, 83
Декстран 198, 208, 535
Денатурация 21, 22
Денатурирующие агенты 21, 22
Детекторы
аргоновые ионизационные 191, 192
в газожидкостной хроматографии 191 и сл.
ионизационные *Гейгера — Мюллера* 101 и сл.
катарометры 191
пламенно-ионизационные 191, 193
эмульсионные 130—133
Деполяризация флуоресценции 438, 439
Джонстона — Огстона эффект 294
Диализ
мембраны 167—169
обратный 166, 533 и сл.
под давлением 533
равновесный 523—524
через полые стеклянные волокна 169, 170
Диатомовая земля 176, 187
1-Диметиламинонафталин-5-сульфонат-анион как флуоресцентная метка 427, 428, 436
Дискриминатор 109
Диск-электрофорез 235—238
Дисперсия оптического вращения 450—479
аппаратура 464—465
измерение 464 и сл.
интерпретация кривых 466 и сл.
— — эмпирические правила 466
оптически активных молекул 454, 462
отношение к КД 458
и поглощение 458
теория 451—460
Дисульфидные связи 14, 231, 372, 413, 442, 447
Дихроизм, измерение 52
Длина волны максимальная 389

ДНК-полимеразы, анализ 266 и сл.
ДНК-целлюлоза 214 и сл.
Друде уравнение 460

Заливка 67
Замена среды для растущих бактерий 159 и сл.
«Звезда» эксперимент 143 и сл.

α-Излучатели 95
Изотермы адсорбции 176 и сл.
Изоэлектрическая
точка 239, 240, 241
фокусировка 239—242
Иммуноглобулины 247
Иммунодиффузия 251—253
Иммунологические методы, применение в биологическом анализе 243 и сл., 247 и сл., 263—269
Иммунорадиометрический анализ 262 и сл.
Иммуноэлектрофорез 243—245
Ионная лавина 101
Ионообменники
выбор 209—210
общая емкость 208 и сл.
пористость 209, 210
реальная емкость 209
ситовый размер 209, 211
Искривление поля 35

Кавитация 520
Кальцийфосфатный гель 177
Кана электрические весы 353
Карбоксиангидраза, активный центр 436
Карбоксипептидаза А, конформация 406
Катенаны 24, 320—325, 343 и сл.
Катионообменники 207, 208
Квантовый выход 417, 418, 420 и сл.
Клетки
обработка ультразвуком 219, 520 и сл.
с поверхностью которых связан вирус, идентификация, определение иммунологическими методами 272
разделение непрерывным электрофорезом 239
— путем распределения 535
Клубок
неупорядоченный 17, 18, 410, 413, 502
почти беспорядочный 18
Коллаген, электронная микрофотография 76
Колонка
с градиентом плотности Линдерстрема — Ланга 352
капиллярная 190
насадочная 190
для хроматографирования 179
Кольцевой ток 487, 488
Компенсатор 49
Комплимент, фиксация 253—256, 265
Конденсатор
Аббе 36
аберрация 36
апланатический 36
ахроматический 37
регулировка 37
Конканавалин А 217, 218
и сефароза 218
Контраст
в световом микроскопе 39 и сл.
в электронном микроскопе 64—77, 82 и сл.
Концентрирование растворов макромолекул 531—534
Коттона эффект 458 и сл.
Коэффициент
вязкости 361
диффузии 326, 355—358
молярного погашения 286, 289, 453
седиментации 275, 277, 301 и сл.
— влияние заряда 297
— — молекулярной массы 300 и сл.
— — формы 299 и сл.
— зависимость от концентрации 292—294
— — — скорости 295—297
— из зонального центрифугирования 311—313
— определение 344—346
трения 276, 355
Кронига — Крамерса преобразование 460
Круговое напыление 77
Круговой дихроизм 450—479
аппаратура 465
изучение конформационных изменений 470—472
— структуры белка и полинуклеотидов 467—470
кривые, интерпретация, эмпирические правила 466
поглощение и 458
преимущества перед ДОВ 461—463
примеры 475—479
теория 451—460

Ламберта — Бера закон 386, 387
Ламинарное течение 362
Лизин, ЯМР-спектр 486, 487
Лизис 254
Лизоцим, ПМР-спектр 500, 501
Линзы
апланатические 31
анастигматы 31
ахроматные 35
конденсорные светового микроскопа 36—39
— электронного микроскопа 61 и сл.
с масляной иммерсией 33, 34
объектива 33 и сл.
полевая 38, 39
электромагнитные 61 и сл.
электронного микроскопа 63
Лиофилизация 533
γ-Лучи 95, 97
регистрация 120 и сл.

Магнитный момент 482 и сл., 484
Мембраны
очистка 218
полупроницаемые 533, 534
из полых волокон 534
Мертвый объем 179
Метод
антитела двойного 259, 260, 261
— флуоресцирующего 55, 272
Арчибальда 328 и сл.
блокирующей способности сыворотки 264, 265
внешней стандартизации 116, 117, 118, 119
внутренней стандартизации 116, 117, 119
временного контакта 141 и сл.
гетеродуплексный 81 и сл., 530 и сл.
двойной диффузии 251
закрытой бумаги 226, 227
замораживания — травления 70
импульсной метки 95
Кляйншмидта 77—82, 203
критической точки 70, 71
наносекундного импульса 445
негативного контрастирования 71, 73—75
отношения каналов 116, 117
оттенения 70, 71 и сл.
пертурбации растворителем 400—402, 405
погружения 144 и сл., 226, 227
позитивного контрастирования 74, 75—77
постоянного контакта эмульсии с образцом 142—147
стартовых условий 213
сцинтилляционный жидкостной 159
темного поля 40—41
флуоресцентных меток и зондов 427—431, 431 и сл.
флуоресцирующих антител 446
Микроскоп
интерференционный 45—46
поляризационный 47—49
— измерение дихроизма 52
— применение 50—52
разрешение 31 и сл.
регулировка 39
схема 38, 39
темнопольный 40—41
теория 28 и сл.
устройство 33—39
фазово-контрастный 42—45
флуоресцентный 53, 446
числовая апертура 32, 33, 34
электронный и авторадиография 151
— *Крева* 64, 84
— контраст 67, 75 и сл.
— методы приготовления образцов 64—82
— отличие от оптического микроскопа 63 и сл.
— подложка (сетка) 61, 64 и сл.
— покрывающие пленки 65 и сл.
— разрешающая сила 64
— сканирующий 84 и сл.
— темнопольный 82 и сл.
Микроскопия
интерференционная 45—46
поляризационная 46—52
темнопольная 40—41
фазово-контрастная 42—45
флуоресцентная 53—58, 446
электронная 82—84
Миоглобин
денатурация 471, 472
круговой дихроизм 467, 468
Миозин из мышц кролика, получение реплик 69
Молекулярная масса, определение методом
гель-проникающей хроматографии 200—201
— — тонкослойной 206—207
по напряжению сдвига 518 и сл.
приближения к равновесию 328—329
седиментации — диффузии 326

седиментационного равновесия 326—328
— — в градиенте плотности 331—332
электрофореза на ДСН-геле 231—232
Молекулярная фильтрация 165—170
Монодисперсность 283
Моффита уравнение 461

Насадка 179
Нативная структура, определение 21
Натриевая ошибка 92
Нафталин, поглощение света 407
Носитель или матрица в хроматографии 173, 175 и сл.
Нуклеиновые кислоты. *См. также* Дезоксирибонуклеиновая кислота и Рибонуклеиновая кислота
анализ методом седиментации 291
гибридизация 22 и сл.
ДОВ и КД 472—474
метод пертурбации растворителем 405 и сл.
осаждение сульфатом стрептомицина 219
основания 14, 15, 16
разделение с помощью гель-электрофореза 233, 234
структура 14 и сл., 16
стэкинг-конформации оснований 473, 474, 476 и сл.
флуоресцентные метки и зонды 427, 428

Объективы 33, 34, 35
Оказаки фрагменты, обнаружение 322 и сл.
Окись алюминия как носитель 177, 187
Окрашивание срезов 67
Окуляры 33, 35 и сл.
Гюйгенса 35
Кельнера 35, 36
компенсирующие 35, 36
Рамсдена 35, 36
Оптика
абсорбционная в ультрацентрифуге 286, 291
геометрическая 28 и сл.
интерференционная в ультрацентрифуге 286, 288—289
шлиреновская 286, 287
Оптическая
активность 453 и сл.
плотность 386 и сл.
Опухоли, диагностика с помощью радиоиммунологического анализа 269 и сл.
Осветление растворов при помощи фильтров 158 и сл.
Освещение
Кёлера 37, 38, 39
критическое 37, 40
световой конус 38, 41
Осевое соотношение 360, 364
Основное состояние 384 и сл.
Осциллятор механический для измерения плотности 353 и сл.

Парциальный удельный объем 276
измерение 350—355
Пептидная связь 14, 17, 521
Пептидные карты 184—187
Первичная структура 16
Перенос энергии 432—436
Пикнометр 351 и сл.
pH 88—94
буфера, зависимость от концентрации ионов 91 и сл.
измерение 88—91
— осложнения 91—94
pH-метр 88
Плавучести фактор 276
Пленки-подложки, получение 65, 66
Плотность
измерение 351—354
определение седиментацией в градиенте плотности 332—335
Поглощение света
аппаратура для измерения 387—388.
теория 383—387
Подвижность электрофоретическая, определение 223
Подложка 112
Показатель преломления 29, 30, 453, 455, 458
Полиадениловая кислота 473, 476 и сл.
Полиакриламид
гель-электрофорез 229, 232 и сл.
получение гелей 198 и сл.
Полиакриламидный гель, диск-электрофорез 235—238
Полиаминокислоты, структуры 413
Поли-γ-бензил-L-глутамат, ЯМР-спектр 502, 503
Полидезоксирибонуклеотиды, структура 478 и сл.
Поли-L-лизин, ДОВ и КД 468, 469 и сл.
Полинуклеотиды 16

гибридизация 525 и сл.
ДОВ и КД 472—474
— — примеры 475 и сл.
определение числа цепей 430, 431
спектры ЯМР 498 и сл., 510 и сл.
структуры 24
ферментативный гидролиз 395
Полипептиды 15
Полицитидиловая кислота, структура 475, 476
Поляризатор 47, 48, 49
Поляризационный анализ флуоресцентный 444 и сл.
Поляризация
собственная (предельная) 438 и сл.
флуоресценции 437—439, 440
— применение 439—444
частичная 437
Поперечная связь 25 и сл.
Правило буферов 211
Преципитин 250, 251
Проницаемость, измерение 123 и сл.
Пропуск 24, 25
Простагландины, роль в организме человека 271
Профлавин 427, 428, 538

Радиоактивность, измерение 100—103, 110 и сл.
единицы 99
отделение осадков 159
Радиоактивные изотопы 98 и сл.
Радиоактивный распад, теория 97—100
Радиоиммунологический анализ 257—261, 270
примеры 269—271
Радиохимическая чистота 99 и сл.
Радиус инерции 17
Разрыв 24, 25, 320—325, 375
Рамана рассеяние 411
Рассеивание света 383
Растворители-пертурбанты 400
Расщепление молекул
в результате гидродинамического сдвига 517—521
ультразвуком 520 и сл.
Реакции
перекрестные 248, 267 и сл.
— примеры 267—269
преципитации 250 и сл., 263
— гель-диффузные 251—253
Релаксация
спин-решеточная (продольная) 492, 493
спин-спиновая (поперечная) 492, 493
Ренатурация 22
Реопексия 365, 366
Реплики, получение 68 и сл.
«Репортерные» группы 406
Рибонуклеаза А, свойства активного центра 505—507
Рибонуклеиновая кислота 14, 54
гибрид с ДНК 23
зональная седиментация 313 и сл.
информационная, анализ связывания с фильтром 161—163
— очистка 529 и сл.
метаболизм 204
определение числа спаренных и неспаренных оснований 413
очистка 202, 216, 217
разделение 216, 217
— нуклеозидов хроматографированием 212
— посредством гель-электрофореза 233
транспортная, структура 405 и сл., 411, 511
Родамин 427, 428

Самопоглощение энергии образцом 139
радиоактивным 112, 113, 119 и сл.
Сверхспираль 25
плотность 25
Свет
запаздывание 453
неотклоненный 42, 43
отклоненный 42, 43
плотность поляризации 451, 455
поглощение 453
поляризованный 450 и сл.
— вращение 454, 455
— описание 451, 452
— поглощение 407
— по кругу 452 и сл.
Сдвиг 361
гидродинамический 517—521
градиент 361
напряжение 361, 378, 379
Седиментационное равновесие 275
в градиенте плотности 329—332
молекулярная масса, определение 326—329, 331—332
парциальный удельный объем 354 и сл.
теория 326—332
Седиментация 275—346
зональная 283

— в самогенерирующемся градиенте плотности 317—319
коэффициент 275
примеры использования 302—306
скоростная 283—286
— примеры 302—304
скорость 275
— концентрационная зависимость 292—294
— эффект *Джонстона — Огстона* 294
теория 276 и сл.
Сетка 61
Сефадекс 176, 199, 210, 220
Сефароза 198, 199, 217, 218
и бромциан 218
и конканавалин А 217, 218
как матрица в аффинной хроматографии 217
Силикагель 176, 177, 187
Сканирование 497
Сорбент 173, 175 и сл.
Спектроскопия
абсорбционная, идентификация веществ 395 и сл.
— измеряемые параметры 388—390
— исследование химических реакций 394 и сл.
— максимумы поглощения 389
— правила для интерпретации 392
— примеры 393—406
дифференциальная 440—403, 404 и сл.
инфракрасная 408—411, 413
комбинационного рассеяния 411—413
смешанная оптическая 357 и сл.
флуоресцентная 415—448
Спектрофлуориметр 418, 419
Спектрофотометры 387 и сл.
Спектры
поглощения 385, 392
флуоресценции 433
Спин 482, 483
Спиновые метки 511 и сл.
Спин-спиновое
взаимодействие 490—492
релаксация 492 и сл.
Спираль
двойная 19 и сл.
тройная 19, 20
α-Спираль 19, 410, 413, 467, 468, 502
β-Спираль 410, 413
Спираль — клубок переход 21, 403, 425, 441 и сл.
Срезы 67 и сл.
Стационарная фаза *см.* Сорбент
Стеариновая кислота, ИК-спектр 409
Стекловолокно, полые волокна для диализа 169, 170
Стирагель 199
Стрептомицин, сульфат, осаждение нуклеиновой кислоты 218
Структура
денатурированная 21
β, складчатая 19, 20 и сл.
спиральная 18 и сл.
частично денатурированная 21
Стэкинг-взаимодействие 236, 473, 474, 476 и сл.
Сцинтилляция 105 и сл.
Счетчик
Гейгера — Мюллера см. Гейгера — Мюллера счетчик проточный без окна 103, 104
сцинтилляционный 103—120
— внешняя стандартизация 116, 117
— внутренняя стандартизация 116, 117 и сл.
— гасящие агенты 102 и сл.
— жидкостной 103—105
— отношение каналов 116, 117
— ошибка тушения 117
— приготовление образцов 112—116
— фоновый шум 106 и сл.

Таутомерные формы, определение ИК-спектроскопией 410
Температура плавления 22, 397 и сл.
Термоэлемент 420
Тирозин
идентификация скрытых остатков в белке 123
спектр поглощения 390, 391
2-*п*-Толуидилнафталин-6-сульфонат-анион как флуоресцентная метка 427, 429, 430
Третичная структура 16
Триптофан 402, 403 и сл.
спектр дифференциальный 401, 402
— поглощения 417
— флуоресценции 417
Трис-буфер 92, 93
Тритиевый обмен 204, 205, 522
Тропоколлаген, электронная микрофотография 76
Турбулентность 362
Тушение
вследствие резонансного переноса энергии 418
— столкновения 418

в счетчике *Гейгера — Мюллера* 102 и сл.
— сцинтилляционном 104
за счет разбавления 108, 119
химическое 108, 116, 117
цветовое 108, 119
Тушители 418

Удельная радиоактивность 99
Удельный инкремент рефракции 46
Ультрацентрифуги 277—282
аналитические 277 и сл.
оптические системы 277 и сл., 286—291
препаративные 277, 278, 281 и сл.
ротор 279, и сл., 281
ячейки 279, 280, 283, 284
Упаривание на роторном испарителе 532 и сл.
Уранилацетат для контрастирования 76, 77
Уровни энергетические
вращательные 384
колебательные 384, 412
переходы 385, 386
схема 384, 385, 415
и флуоресценция 415 и сл.
электронные 384 и сл.
Ухтерлони метод 266, 267. *См. также* Метод двойной диффузии

Фаза 42, 452
Фазовая пластинка 43, 44
Фермент
активные центры, идентификация 127 и сл.
— — свойства 424 и сл., 436
изменение структуры методом КД 471
конформационный переход при связывании субстрата 429 и сл.
молекулярная масса, определение 314
обнаружение абсорбцией 394 и сл.
— флуоресценцией 447 и сл.
очистка 218, 219 и сл.
связывание с кофактором 303 и сл.
— с субстратом 509
флуоресцентный анализ 447 и сл.
Фибропласт мыши, микрофотографии 44
Фикоцианин, спектр поглощения 390
Фильтрация мембранная 154—170
замена среды 159 и сл.
иммобилизация 164 и сл.
осветление растворов 158 и сл.
отделение осадков 159
приложение 164—165
счет радиоактивности 159
Фильтры 155—170
бумажные 115
мембранные 164 и сл.
молекулярные 167 и сл.
нитроцеллюлозные 115, 116, 154, 155—165
— и анализ связывания белков 160—165
— измерение радиоактивности 159
— осветление растворов 159
— применение 155—158, 158—165
— связывающие свойства 160—165
— и стекловолокно 158—160
— фильтрование с разрежением 155, 157
из стекловолокна 115, 116, 158, 159
— — и нитроцеллюлозы 158—160
Флавинмононуклеотид, спектр поглощения 390
Флуоресцеин 54, 55, 272, 427, 428
Флуоресцент 105
Флуоресценция 53, 105
аппаратура 418—421
внесенная 427—436. *См. также* Метод флуоресцентных меток и зондов
поляризации 437—446
применение 421—427
собственная 421 и сл.
теория 415—418
Флуорофор внутренний 54
Флуорофоры 418
Фосфодиэфирная связь 17
Фурье преобразование ЯМР 497, 513 и сл.

Херши цикл 24
Химический
обмен 489 и сл.
сдвиг 485—490, 494
Химотрипсин, время вращательной релаксации 445 и сл.
Хинакрилхлорид 428
Хинакрин как внутренний флуорофор 54
Хинакриновый иприт как внутренний флуорофор 57, 58
Хлорофилл, определение ориентации молекул в хлоропласте 443
Холостой объем 179
Хроматин тимуса теленка, электронная микрофотография 85

Хроматография 172—220
адсорбционная, адсорбенты 177
— виды 177 и сл.
теоретические основы 176—177
аффинная 217—218, 249
на бумаге 175, 181—187
— восходящая 182 и сл.
— двумерная 184, 185
— нисходящая 182 и сл.
— обнаружение пятен 184 и сл.
— R_f 183
— сравнение с тонкослойной хроматографией 189 и сл.
— стартовое пятно 182
— фронт растворителя 182
газожидкостная 175, 190—196
— аппаратура 191
— детекторы 191—193. *См. также* Детекторы
— достоинства 195
— идентификация компонентов по сигналам детекторов 193—195
— колонки 190
— разрешающая способность 195
— применение 195 и сл.
гель-проникающая 175, 179, 196—207
— достоинства 200 и сл.
— колонки 196, 197
— материалы для 197—200
— молекулярная масса, определение 200 и сл.
— неполярные растворители 198 и сл.
— применение 200—205
— теория 196—197
— тонкослойная 205—207
на гидроксиапатите 177, 216 и сл.
на гистоне на кизельгуре 216
ионообменная 207—213
— градиентное элюирование 211, 212
— ионные условия 211
— ионообменники 207—211
— методика 211—213
— правило буферов 211
— стартовые условия 211
история 172
колонки 178—181
на метилированном альбумине, на кизельгуре 215 и сл.
подвижная фаза 173
распределительная *см.* Хроматография на бумаге, Хроматография газожидкостная, Хроматография гель-проникающая, Хроматография тонкослойная стационарная фаза 173
тонкослойная 175, 187—190
— камера для проявления пластинки с тонким слоем 188
— преимущества 189, 190
— разрешающая способность 189
— сравнение с хроматографией на бумаге 187, 189 и сл.
Хромосомы, идентификация по флуоресценции 54, 55, 57
Хромофоры 383 и сл., 407, 421
абсорбционные свойства 390—392
асимметрия 453
схемы энергетических уровней 415, 416
флуоресцирующие 427

Целит как носитель 176
Целлюлоза
ацетат в электрофорезе 228
как ионообменник 208, 210 и сл.
как носитель в хроматографии на бумаге 181, 182
Центрифугирование
зональное (полосовое) 307—311, 311—325
— коэффициент седиментации 311—312
— примеры использования 313—316, 322—325
равновесное 527

α-Частицы 134 и сл.
β-Частицы 95, 96 и сл.
в авторадиографии 133, 134, 135
Черенкова излучение 107
Четвертичная структура 16
Число спиновое квантовое 483
Числовая апертура 32, 33, 34

Шлиреновская оптика 286, 287

Эксимеры 436
Электрод
каломельный 89 исл.
комбинированный 94
металлический 94
сравнения 89, 90, 93
стеклянный 88 и сл., 92, 93
Электронная пушка 63
Электрофорез 223—245
на агарозном геле 228, 233 и сл.

аппаратура 225, 226
блок-*см.* Блок-электрофорез
высоковольтный 226, 227 и сл.
гель-*см.* Гель-электрофорез
диск-*см.* Диск-электрофорез
на ДСН-геле 231 и сл.
зональный 224, 225—239
— на бумаге 225—228
иммуно- см. Иммуноэлектрофорез
на крахмальном геле 228, 229
непрерывный 224, 225, 238 и сл.
низковольтовый 225, 226, 227
с подвижной границей 224
на полиакриламидном геле 228—238, 243
теория 223 и сл.
Эллиптичность 457
Элюат 179
Элюирование 179 и сл.
градиентное 180 и сл.
ступенчатое или периодическое 179
в хроматографии на бумаге 184
объем 179
Эмиттер 137
Эритроциты крови человека, сканирующая электронная микрофотография 86
Этидия бромид 340, 341, 427, 428
Эффективность счета 106 и сл., 116—120

Ядерные эмульсии 130—133
нанесение на образец 132, 133
типы 130
толщина 139
треки 133—135, 140
фон 140 и сл.
эффективность 139
Ядерный магнитный резонанс 481—513
аппаратура для измерения 493—494
белков 498 и сл., 500—511
введение спиновых меток 511 и сл.
идентификация пиков 498
интенсивность линий 494
полинуклеотидов 498 и сл.
правила интерпретации спектров 495—496
разрешение сигналов в спектре 497 и сл.
расщепление линий в спектре 490 и сл., 495
регистрация сигналов низкой частоты 497
теория 481—485
фурье-преобразование 497, 513 и сл.
химический сдвиг 485
— — внутримолекулярное экранирование 487 и сл.
— — межмолекулярные эффекты 488
— — парамагнитные эффекты 488
— — химический обмен 489
ЯМР-спектрометр 493 и сл.
Ячейка гранецентрирующая 357, 358

Содержание

Предисловие редактора перевода 5

Предисловие 7

ГЛАВА 1. **Характеристика макромолекул** 11
Полипептидные и полинуклеотидные цепи 14
Структуры полимеров 16
Понятие о нативных и денатурированных структурах 21
Линейные и циклические полинуклеотидные молекулы 24
Поперечные связи 25
Список литературы 26
Задачи 26

ЧАСТЬ I. **Непосредственное наблюдение** 28

ГЛАВА 2. **Оптическая микроскопия** 28
Основы теории микроскопии 28
Устройство микроскопа 33
Линзы объектива 33
Окуляры 35
Конденсорные линзы 36
Регулировка микроскопа 39
Контраст 39
Метод темного поля 40
Фазово-контрастная микроскопия 42
Применение фазово-контрастной микроскопии 45
Интерференционная микроскопия 45
Поляризационная микроскопия 46
Применение поляризационной микроскопии в биологии и биохимии 50
Использование поляризационного микроскопа для измерения дихроизма 52
Флуоресцентная микроскопия 53
Приложение 58
Регулировка фазово-контрастного микроскопа 58
Список литературы 58
Задачи 59

ГЛАВА 3. **Электронная микроскопия** 61
Принцип действия электронного микроскопа 61
Методы приготовления образцов и получения контрастного изображения 64
Получение образцов на подложке 64

Подготовка образцов и увеличение контраста 67
Специальные способы получения изображения 82
Электронная микроскопия темного поля 82
Микроскоп Крева 84
Сканирующий микроскоп обратного рассеяния 84
Список литературы 86
Задачи 87

ЧАСТЬ II. **Общие лабораторные методы 88**

ГЛАВА 4. **Измерение pH** 88
Осложнения при измерении pH 91
Зависимость pH от концентрации ионов 91
Загрязнение и нарушение показаний электродов 92
Натриевая ошибка 92
Проблема трис-буфера 93
Типы электродов 93
Использование индикаторной бумаги 94
Избранная литература 94

ГЛАВА 5. **Введение радиоактивных меток и измерение радиоактивности** 95
Типы ядерных распадов, используемые в биохимии 95
Бета-распад 96
Распад с испусканием γ-лучей 97
Свойства радиоактивного распада химических соединений 97
Измерение β-радиоактивности методами, основанными на ионизации газов 100
Измерение радиоактивности жидкостными сцинтилляционными счетчиками 103
Процесс сцинтилляции 105
Фоновый шум 106
Тушение 108
Пропорциональный счет и анализ амплитуды импульсов 109
Приготовление образцов 112
Выбор растворителя, смешиваемого с водой 114
Растворение образца 115
Сорбция на мембранных фильтрах 115
Определение эффективности счета с помощью анализа амплитуды импульсов 116
Регистрация γ-лучей 120
Примеры использования радиоактивных препаратов 122
Список литературы 128
Задачи 128

ГЛАВА 6. **Авторадиография** 130

Ядерные эмульсии, используемые в биологических исследованиях 130
Изотопы, обычно используемые в биологических и биохимических исследованиях 133
Длина трека различных излучаемых частиц 133
α-Частицы 134
β-Частицы 135
Взаимное расположение источника излучения и эмульсии 137
Факторы, влияющие на выбор изотопа и соотношение эмиттер—эмульсия 138
Разрешение 138
Эффективность 139
Фон 140
Методики осуществления контакта между эмульсией и образцом 141
Метод временного контакта 141
Метод постоянного контакта 142
Молекулярная авторадиография 148
Авторадиография и электронная микроскопия 151
Список литературы 152
Задачи 152

ГЛАВА 7. **Мембранная фильтрация и диализ** 154

Фильтры из нитроцеллюлозы и мембранная фильтрация 155
Фильтры из стекловолокна 158
Фильтрация с использованием фильтров из нитроцеллюлозы и стекловолокна 158
Осветление растворов 158
Отделение осадков для измерения радиоактивности 159
Замена среды для растущих бактерий 159
Нитроцеллюлозные фильтры и анализ связывания 160
Различные приложения мембранных фильтров 164
Диализ и молекулярная фильтрация 165
Диализ через полые стеклянные волокна 169
Список литературы 170
Задачи 171

ЧАСТЬ III. **Разделение и идентификация веществ** 172

ГЛАВА 8. **Хроматография** 172

Распределительная хроматография 173
Теоретические основы распределительной хроматографии 173

Примеры распределительной хроматографии 175
Адсорбционная хроматография 176
Теоретические основы адсорбционной хроматографии 176
Виды адсорбционной хроматографии 177
Работа колонки 178
Хроматография на бумаге 181
Экспериментальная методика хроматографии на бумаге 182
Обнаружение и идентификация пятен 184
Пептидные карты: специальное использование бумажной хроматографии при изучении белков 184
Тонкослойная хроматография 187
Газожидкостная хроматография 190
Обнаружение веществ в элюате 191
Идентификация компонентов по сигналам детектора 193
Достоинства газожидкостной хроматографии 195
Применение газожидкостной хроматографии 195
Гель-проникающая хроматография 196
Теоретические основы гель-проникающей хроматографии 196
Материалы для гель-проникающей хроматографии 197
Достоинства гель-проникающей хроматографии 200
Приложения гель-проникающей хроматографии 202
Тонкослойная гель-проникающая хроматография 205
Приложения тонкослойной гель-проникающей хроматографии 206
Ионообменная хроматография 207
Свойства ионообменников 207
Выбор ионообменника 209
Выбор пористости и ситового размера 210
Выбор pH, буферов и ионных условий 211
Методика ионообменной хроматографии 211
Приложения ионообменной хроматографии 213
Специальные методики в хроматографии нуклеиновых кислот и белков, связывающихся с нуклеиновыми кислотами 214
Хроматография на ДНК-целлюлозе 214
Колонки с метилированным альбумином на кизельгуре (МАК) 215
Колонки с гистонами на кизельгуре 216
Хроматография на гидроксиапатите 216
Аффинная хроматография 217
Приложение 219
Очистка фермента: пример использования многих хроматографических методик 219
Список литературы 220
Задачи 221

ГЛАВА 9. **Электрофорез** 223

Теория электрофореза 223
Виды электрофореза 224
Зональный электрофорез 225
Непрерывный (поточный) электрофорез 238
Изоэлектрическая фокусировка 239
Препаративный электрофорез в больших масштабах 243
Блок-электрофорез 243
Электрофорез на колонках с полиакриламидом 243
Иммуноэлектрофорез 243
Список литературы 245
Задачи 246

ГЛАВА 10. **Иммунологические методы** 247

Иммунологическая система 247
Получение антител 248
Реакция антигена с антителом 249
Иммунные реакции, используемые в биологическом анализе 250
Реакция преципитации 250
Гель-диффузионные реакции преципитации и иммунодиффузия 251
Фиксация комплемента 253
Торможение фиксации комплемента и пассивная агглютинация 256
Радиоиммунологический анализ 257
Иммунорадиометрический анализ 262
Примеры использования иммунологических методов в биологическом анализе 263
Примеры использования радиоиммунологического анализа 269
Иммунологические методики для локализации веществ в клетках, тканях и молекулах; флуоресцентные антитела и антитела, связанные с ферритином 272
Список литературы 272
Задачи 273

ЧАСТЬ IV. **Гидродинамические методы** 275

ГЛАВА 11. **Седиментация** 275

Основы теории скорости седиментации 276
Оборудование для ультрацентрифугирования 277
Распределение концентрации в эксперименте по скоростной седиментации в секторной ячейке 283
Измерение распределения концентрации в аналитической ячейке 286
Факторы, влияющие на скорость седиментации 292

Зависимость *s* от концентрации 292
Зависимость седиментации от скорости 295
Влияние заряда 297
Стандартные коэффициенты седиментации 297
Факторы, влияющие на значение стандартного коэффициента седиментации 299
Трение: влияние формы 299
Молекулярная масса 300
Метод точного измерения коэффициента седиментации 301
Примеры использования скоростной седиментации 302
Зональное центрифугирование в предварительно подготовленном градиенте плотности 306
Определение коэффициента седиментации с помощью зонального центрифугирования в предварительно приготовленном градиенте плотности 311
Примеры использования зонального центрифугирования в препаративной ультрацентрифуге 313
Зональная седиментация в самогенерирующемся градиенте плотности 317
Седиментация ДНК при щелочных значениях pH 319
Определение молекулярной массы методом седиментации — диффузии 326
Измерение молекулярной массы методом седиментационного равновесия 326
Определение молекулярной массы методом приближения к равновесию (метод Арчибальда) 328
Седиментационное равновесие в градиенте плотности 329
Измерение молекулярной массы методом седиментационного равновесия в градиенте плотности 331
Определение плотности путем седиментации в градиенте плотности 332
Приложение 344
Определение *s* 344
Список литературы 346
Задачи 347

ГЛАВА 12. **Парциальный удельный объем и коэффициент диффузии 350**
Измерение парциального удельного объема 350
Суммирование $\bar{v}$ мономерных остатков макромолекулы 351
Методы, основанные на определении плотности 351
Параллельное измерение седиментационного равновесия растворов в H_2O и D_2O 354
Измерение коэффициента диффузии 355
Список литературы 358
Задачи 359

ГЛАВА 13. **Вязкость** 360

Основы теории вязкости 360
Влияние макромолекул на вязкость раствора 362
Измерение вязкости 367
Капиллярный вискозиметр Оствальда 367
Капиллярный вискозиметр Уббелоде 368
Вискозиметр Куэтта 369
Ротационный вискозиметр Зимма — Крозерса с плавающим ротором и его модификация с погруженным ротором 370
Соотношение между характеристической вязкостью и молекулярной массой 372
Примеры использования вискозиметрии 373
Измерение вязкоэластичности растворов ДНК 378
Список литературы 381
Задачи 381

ЧАСТЬ V. **Спектроскопические методы** 383

ГЛАВА 14. **Абсорбционная спектроскопия** 383

Общая теория поглощения света молекулами 383
Аппаратура для измерения поглощения в видимом и ультрафиолетовом свете 387
Параметры, измеряемые в абсорбционной спектроскопии 388
Факторы, влияющие на абсорбционные свойства хромофора 390
Применение абсорбционной спектроскопии в видимой и УФ-областях спектра 393
«Репортерные» группы 406
Поглощение поляризованного света 407
Инфракрасная спектроскопия 408
Техника измерения ИК-спектров 408
Информация, содержащаяся в инфракрасных спектрах 409
Применение инфракрасной спектроскопии 410
Спектроскопия комбинационного рассеяния 411
Список литературы 413
Задачи 413

ГЛАВА 15. **Флуоресцентная спектроскопия** 415

Общая теория флуоресценции 415
Аппаратура для измерения флуоресценции 418
Изучение белков путем измерения их собственной флуоресценции 421
Информация о конформации и участках связывания в белках,

полученная путем изучения собственной флуоресценции белков 423
«Внесенная» флуоресценция (метод флуоресцентных меток и зондов) 427
Метод флуоресцентных меток и перенос энергии 431
Эксимеры 436
Поляризация флуоресценции 437
Применение поляризации флуоресценции для изучения белков и нуклеиновых кислот 439
Другие применения поляризации флуоресценции 443
Поляризационный анализ с возбуждением в импульсном режиме 444
Особые случаи использования флуоресценции в биологии и биохимии 446
Список литературы 448
Задачи 449

ГЛАВА 16. **Дисперсия оптического вращения и круговой дихроизм** 450
Общая теория ДОВ и КД 451
Относительная оценка методов ДОВ и КД 460
Аппаратура для измерения ДОВ и КД 464
Интерпретация кривых ДОВ и КД 466
Применение ДОВ и КД для изучения структуры белков и полипептидов 467
Изучение конформационных изменений методом КД 470
Измерение ДОВ и КД в случае полинуклеотидов, нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов 472
Примеры использования методов ДОВ и КД для изучения структуры полинуклеотидов 475
Список литературы 479
Задачи 479

ГЛАВА 17. **Ядерный магнитный резонанс** 481
Основы теории ЯМР 481
Химический сдвиг 485
Внутримолекулярное экранирование 487
Парамагнитные эффекты 488
Межмолекулярные эффекты 488
Химический обмен 489
Спин-спиновое взаимодействие 490
Процессы релаксации 492
Аппаратура для измерения ЯМР 493
Данные, получаемые из спектров ЯМР 494
Технические проблемы ЯМР и их решение 496
Отнесение линий для белков и полинуклеотидов 498

Определение химической структуры малых молекул 500
Использование ЯМР для изучения структуры белка 500
Использование ЯМР для изучения структуры полинуклеотидов 510
Введение спиновых меток 511
Фурье-спектроскопия ЯМР 513
Использование других ядер (не протонов) 514
Список литературы 515
Задачи 516

ЧАСТЬ VI. **Разные методы** 517

ГЛАВА 18. **Разные методы** 517

Гидродинамический сдвиг и деградация ультразвуком 517
Водородный обмен 521
Равновесный диализ 523
Гибридизация одноцепочечных полинуклеотидов 525
Обнаружение гибридизации с помощью равновесного центрифугирования в растворе хлорида цезия 527
Гибридизация на нитроцеллюлозных фильтрах 527
Примеры использования гибридизации 529
Концентрирование растворов макромолекул 531
Высаливание с помощью сульфата аммония 531
Упаривание на роторном испарителе 532
Лиофилизация 533
Диализ под давлением 533
Обратный диализ 533
Мембраны из полых волокон 534
Разделение путем распределения между растворами декстрана и полиэтиленгликоля 535
Двойное лучепреломление в потоке 536
Список литературы 538
Задачи 538

Словарь терминов 540

Ответы к задачам 545

Глава 1 545
Глава 2 546
Глава 3 547
Глава 5 548
Глава 6 549
Глава 7 551
Глава 8 551
Глава 9 552
Глава 10 553